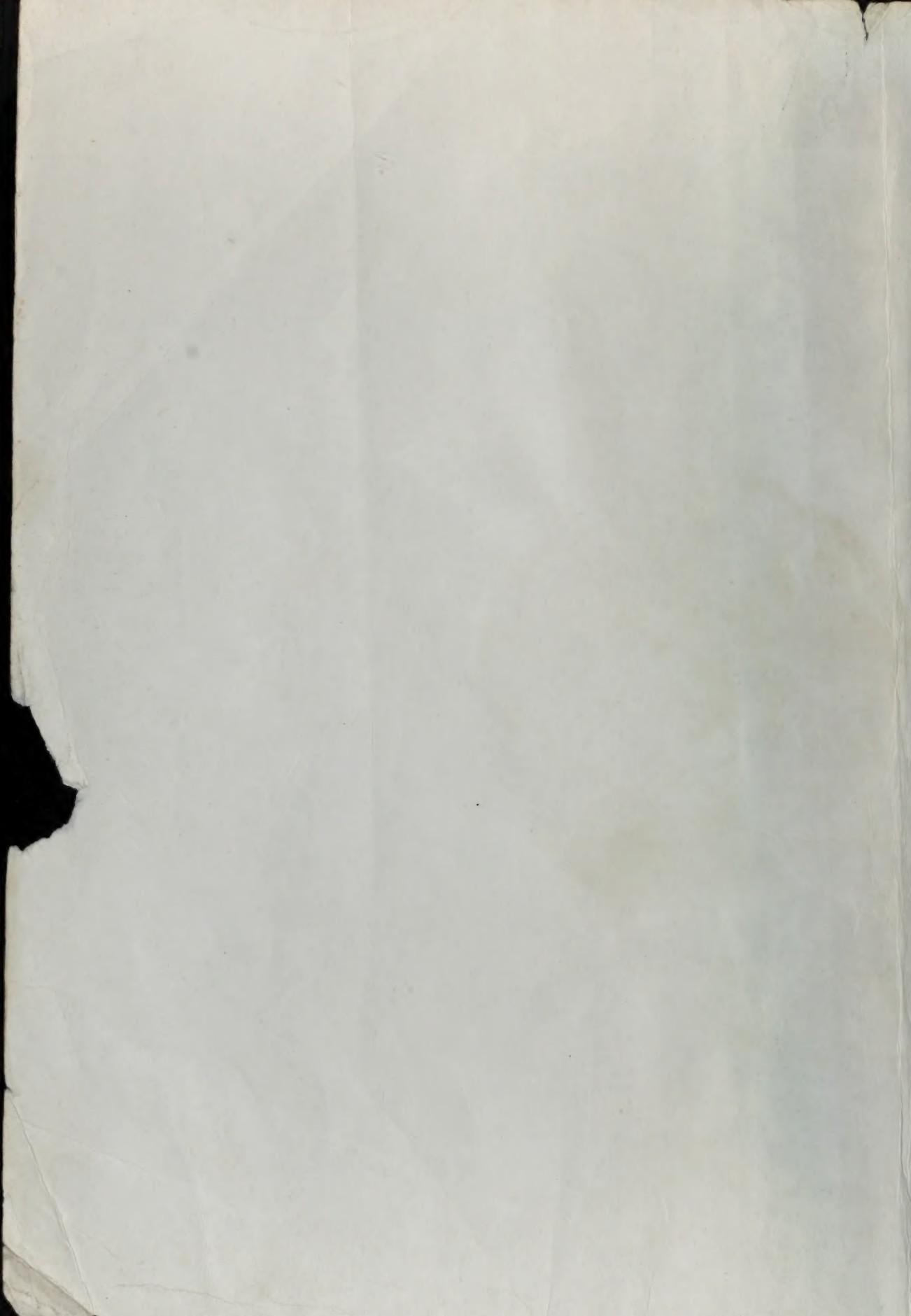


生物化学实验技术丛书

生物化学制备技术

苏拔贤 主编

科学出版社



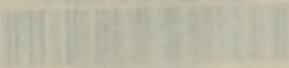
1726

生物化学制备技术

生物化学制备技术

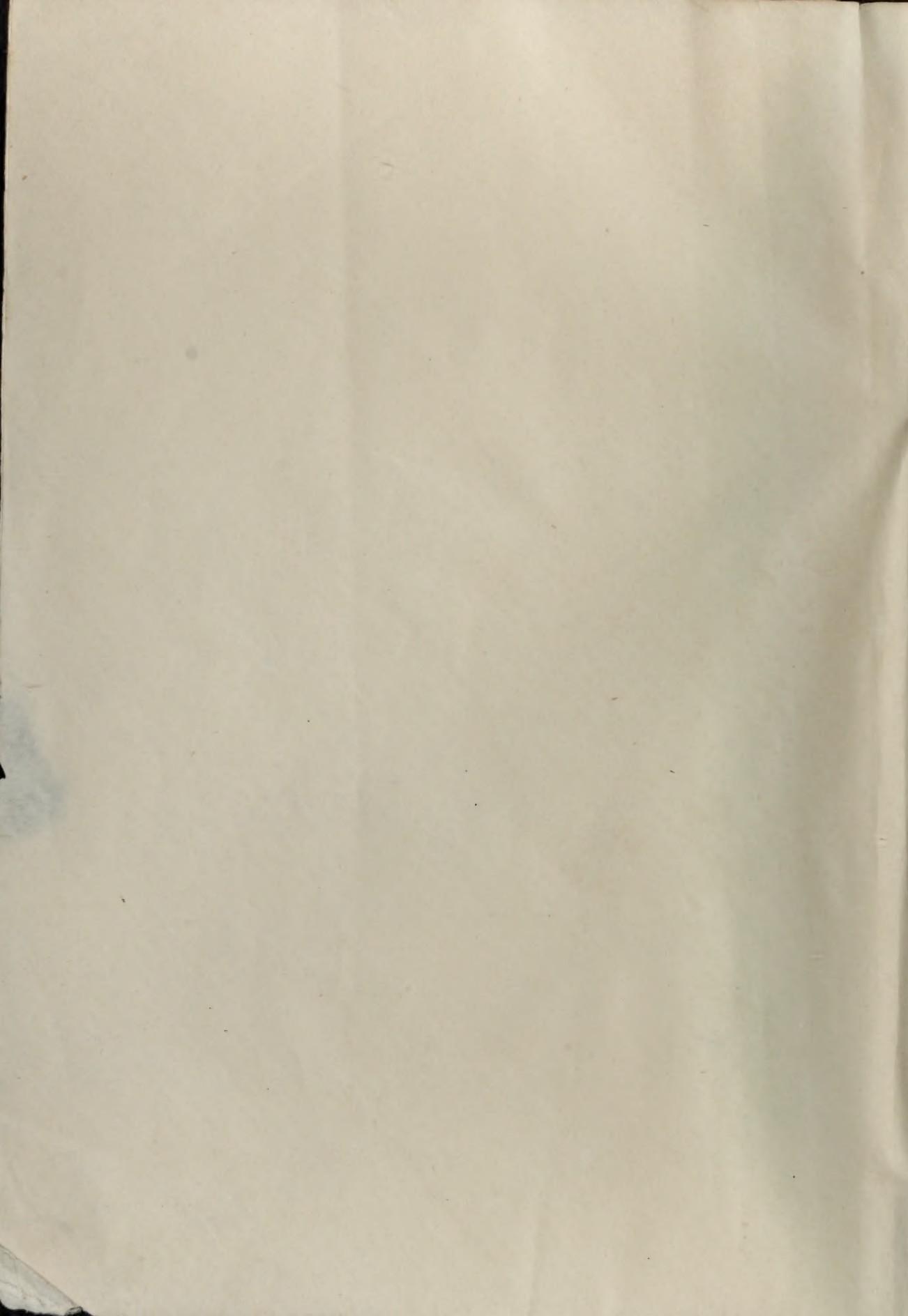
刘家林主编

中国科学院植物研究所



出版时间

科学出版社



58.1734
261

号 S00 字號 (京)

编者的话

生物化学实验技术丛书

生物化学制备技术

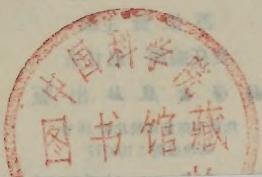
苏拔贤 主编

本书于各方面的內容是根据以至国内外的文献、并集成正在开展的生物技术。随着我国生物研究工作的进展，国外新技术的引进、国内新技术的开发、将不断补充新的內容。

本书如能有实用技术，今后的进一步发展，将使该技术在生产上发挥更大的作用。

本书如能有实用技术，今后的进一步发展，将使该技术在生产上发挥更大的作用。

本书如能有实用技术，今后的进一步发展，将使该技术在生产上发挥更大的作用。



中科院植物所图书馆



S0011868

科学出版社

元 08.45 : 1994

26394

(京)新登字092号

内 容 简 介

生化制备技术涉及面很广，包括材料处理、提取、各种分离手段的使用，以至浓缩、结晶、纯度测定和保存等内容。由于生化物质种类繁多，制备方法多种多样，不可能有一个统一操作规程，因此，本书着重介绍实验的设计思路、有关分离技术的原理和实验条件的选择，并列举各种例子加以说明。书末并附有各类生化物质制备的参考文献。

本书可供生物化学、生物学、医药、食品工业技术人员及有关大专院校师生参考。

生物化学实验技术丛书

生物化学制备技术

苏拔贤 主编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京市东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1986年1月第一版 开本：787×1092 1/16

1994年8月第二次印刷 印张：20 1/2

印数：4201—6300 字数：467 000

ISBN 7-03-004198-4/Q·515

定价：24.60 元

编 者 的 话

在 20 世纪有了惊人发展的生物学中，生物化学是最活跃的分支学科之一。促使生物化学迅速发展的重要因素之一是新技术的开发。

过去一、二十年间生物化学的实验方法日趋专门化和复杂化，牵涉到生化实验工作的领域也越来越多。今天，农业、工业、医学、环境以及生命科学等的研究都涉及生物化学研究，生化实验已成为常规的实验操作了。因此，对于开始进行生化研究的工作者，或者要开拓自身专业领域以外生化研究领域的工作者来讲，都希望能有一本合适的实验指导书。有鉴于此，科学出版社于 1977 年夏委托中山大学在广州召开了由国内从事生化工作的部分研究所（中国科学院上海生物化学研究所、中国科学院微生物研究所）、大学（中山大学、北京大学、武汉大学、南开大学、南京大学、复旦大学）、工厂（江门甘蔗化工厂、生物化学研究所东风生化试剂厂）参加座谈会，拟定了编写一套切实可行，供有关工作者随时查阅参考的《生物化学实验技术丛书》。

本《丛书》各册编写的内容是建国以来国内已经应用、开展或正在开展的生化技术。随着我国生化研究工作的进展，国外新技术的引进，国内独创技术的开展，将不断补充新的内容。

本《丛书》着重在实验技术，各册内容力求做到：

- (1) 理论部分简洁明了，实验部分力求重复性高；
- (2) 直接触及实验设计的各项要领；
- (3) 指出实验操作中应注意的地方；
- (4) 尽可能多地举例说明。

本《丛书》的编写，虽经大家共同努力，但缺点错误在所难免，热情希望读者批评指正。如果本《丛书》的出版，能推动生物化学的进展，为实现科学技术现代化作出一些贡献，编者将感到十分高兴。

前 言

《生物化学制备技术》分册，内容包括生物化学制备技术特点、实验设计原理，有关生化制备一些常用方法如提取、沉淀、过滤与超滤、结晶、浓缩与干燥、样品保存，以及在分离纯化时使用较多的色谱法、超离心技术等。与制备有关的分析鉴定方法，则分别由其他分册予以介绍，使本分册篇幅与其他分册大致相同。

尽管如此，生化制备技术所涉及的面还是很宽的，任何一类生化物质的制备方法或制备方法中某一技术都可以写成一本专著。在实际工作中我们还体会到各类生化物质制备的方法、手段是很不相同的，即使同一种生化物质也有多种制备方法，就是同一生化物质，采用同一制备方法，也因材料差异、设备和条件的不同、工作人员的习惯经验等彼此工艺流程并不一样。所以本分册编写的指导思想，一方面是作为《生物化学实验技术丛书》整体的一部分，内容选择上与其他分册互相呼应、互相补充；另方面希望通过本书的介绍，使读者对生化制备技术有一比较系统认识。因此，在内容方面我们尽可能把有关技术原理讲清楚，并适当多举一些例子加以说明，企图使理论与实例结合起来，起到触类旁通的作用。同时在本书末尾，附上各类生化物质制备及测定的参考资料，以便读者查阅。

参加本书编写的有：苏拔贤、程明哲、卓肇文、劳子谦。附录部分由粟舜英编译。编写过程中，上海生物化学研究所东风生化试剂厂顾涵英同志、香港中文大学生化系江润祥教授等均先后赠送了大量珍贵图书资料。本书初稿完成后，得到北京大学王镜岩副教授、中山大学曾淑云副教授、陈俊民副教授等在百忙中给予审阅并提出了许多宝贵意见。全书编写得以完成，还由于江门甘蔗化工厂、中国科学院微生物研究所、上海生化制药厂和中山大学生化教研室同志们的具体帮助和积极支持，在此谨向这些同志致以最衷心的感谢！

由于我们水平所限，实践经验很少，书中肯定存在不少错误和缺点，恳请读者批评指正。

苏拔贤

1983.8.

目 录

第一章 生物化学制备技术特点及实验设计原理	1
第一节 生物体组成及生物分子间的作用力.....	1
一、生物体组成成分	1
二、生物分子间的作用力	2
第二节 生化分离制备方法特点及基本原理.....	6
一、生化分离制备方法特点	6
二、生化分离制备方法基本原理	7
第三节 生化分离制备实验的设计及实验方法的选择.....	8
一、生化分离制备实验的设计	8
二、分离纯化各阶段对实验技术的选择	16
参考文献.....	22
第二章 提取及溶剂分离法	23
第一节 引言.....	23
第二节 选用的溶剂与物质溶解度的一般规律.....	23
第三节 影响物质溶解度的几个主要因素.....	26
一、离子强度	26
二、pH 值	26
三、温度	27
四、去垢剂	27
第四节 固一液萃取中扩散作用的应用.....	27
第五节 液一液萃取时分配定律的应用.....	28
第六节 提取时对具有生理活性物质的保护措施.....	29
第七节 各类物质的提取分离.....	30
一、蛋白质和酶的提取分离	30
二、核酸的提取分离	37
三、脂类化合物的提取分离	44
四、其他脂溶性生化物质的提取分离	45
五、糖、氨基酸及其他水溶性生化物质的提取分离	47
六、植物次生物质的提取及溶剂系统分离的选择	48
参考文献.....	49
第三章 沉淀及沉淀剂	51
第一节 引言.....	51
第二节 盐析法.....	51
一、基本原理	51
二、影响盐析的若干因素	53

三、一般常用的中性盐盐析方法	56
第三节 有机溶剂沉淀法.....	61
一、基本原理	61
二、有机溶剂的选择及浓度计算	62
三、有机溶剂沉淀的影响因素及注意事项	64
四、有机溶剂沉淀法实例	65
第四节 等电点沉淀法.....	68
第五节 生成盐类复合物沉淀法.....	68
第六节 选择性变性沉淀法.....	72
第七节 非离子多聚物沉淀法.....	73
一、基本原理	73
二、应用方法和范围	74
三、应用实例	76
第八节 其他沉淀剂.....	78
一、氨基酸类	78
二、大分子核酸类	78
三、粘多糖类	78
参考文献.....	79
第四章 生物小分子常用色谱分离法.....	80
第一节 吸附色谱法.....	81
一、吸附过程的本质	81
二、常用吸附剂的特性和应用	82
三、吸附柱色谱的实验技术	86
第二节 离子交换色谱法.....	88
一、离子交换剂的类型	88
二、离子交换树脂的性质	91
三、离子交换的动力学	93
四、离子交换剂的选择	94
五、离子交换色谱法的应用	97
第三节 高效液相色谱法.....	99
一、引言	99
二、高效液相色谱仪概述	100
三、高效液相色谱的固定相填料	103
四、色谱方法的选择	104
五、分离度的调整	104
六、具体操作及注意事项	103
参考文献.....	111
第五章 生物大分子的色谱分离法.....	112
第一节 多糖基离子交换剂色谱法.....	112
一、多糖基离子交换剂的分类	112
二、实验操作技术	114

三、应用实例	117
第二节 分子筛色谱.....	119
一、分子筛色谱的基本原理	119
二、常用凝胶的结构和性质	121
三、分子筛色谱的实验技术	127
四、分子筛色谱的应用	129
第三节 亲和色谱.....	135
一、基本原理	135
二、载体的选择	136
三、琼脂糖的活化及其衍生物的制备	138
四、亲和色谱条件的选择	140
五、亲和色谱应用举例	141
第四节 色谱聚焦.....	145
一、色谱聚焦的原理	146
二、多缓冲剂	147
三、多缓冲交换剂	148
四、操作步骤	149
五、应用实例	152
参考文献.....	153
第六章 制备离心技术.....	155
第一节 引言.....	155
第二节 一般制备离心.....	156
一、过滤式离心机	156
二、沉降式离心机	157
三、分离式离心机	158
四、一般制备离心机的选择	158
第三节 制备超离心.....	159
一、原理和计算	160
二、制备超离心的方法及其选择	163
三、转子、离心管及其选择	168
四、梯度、梯度介质及其选择	173
五、制备超离心的操作	177
六、制备超离心实例	184
参考文献.....	187
第七章 过滤与膜分离技术.....	189
第一节 过滤.....	189
一、过滤速度	189
二、提高滤速的主要措施	189
三、生化工业常用的过滤装置	194
第二节 膜分离技术.....	197
一、透析	198

二、超滤	204
三、电渗析和离子交换膜电渗析	218
参考文献.....	220
第八章 结晶方法.....	222
第一节 结晶与晶体一般性质.....	222
第二节 生化物质形成结晶的条件.....	223
一、样品纯度	223
二、溶液的饱和度	224
三、溶剂的选择	225
第三节 晶核形成及晶体生长的影响因素.....	226
一、晶核的形成及诱导方法	226
二、影响结晶生成的因素	226
第四节 结晶衍生物及重结晶.....	228
一、结晶衍生物	228
二、重结晶	228
第五节 结晶的一般方法.....	229
第六节 有关蛋白质结晶的几项技术.....	231
一、抽提结晶技术	231
二、蛋白质微量结晶技术	233
参考文献.....	237
第九章 浓缩与干燥.....	239
第一节 浓缩.....	239
一、蒸发	239
二、吸收	252
三、膜浓缩	253
四、冰冻融化	255
五、其他	256
第二节 干燥.....	256
一、影响干燥的因素	256
二、常压吸收干燥	257
三、真空干燥	259
四、冷冻干燥	260
五、喷雾干燥	264
六、滚筒干燥	266
参考文献.....	267
第十章 样品的保存.....	269
第一节 样品的保存与环境条件的关系.....	269
第二节 样品保存的一般方法.....	270
第三节 各类生化物质的保存.....	273
一、蛋白质的保存	273
二、核酸的保存	276

三、油脂的保存	276
四、细胞及生物制剂的保存	277
五、小分子生化物质的保存	281
参考文献	282
附录一 各类生化物质制备及测定的参考资料	284
附录二 部分国际单位换算及缓冲液配制方法	305



第一章 生物化学制备技术特点及实验设计原理

苏 拔 贤

第一节 生物体组成及生物分子间的作用力

一、生物体组成成份^[1,2]

现知地球上约有一百八十多万人种动、植物(包括微生物)。从最简单的病毒、细菌直至最复杂的人类,不论它们之间形态上多么不同,但它们最基本组成成份都含核酸和蛋白质两类物质。核酸是遗传信息的携带者,在生物体内指导着各种蛋白质的合成,决定着每一生物个体和种族的差异。蛋白质则担负着机体的生长、发育、感觉、运动、保护、运输营养物质和氧气,消灭外来疾病因素等多种重要生理功能。进化比较高级的生物体,其组成成份除了核酸和蛋白质(包括酶)两大类物质外,还含有糖类、维生素、脂类、激素以及多种多样的代谢中间产物和次生物质。

一个生物体内含有多少生物分子?以及这些生物分子结构、形状、大小如何?都是通过亿万年进化而确定的,每一种生物分子结构与功能不仅十分协调,而且每个分子在空间排列也很有次序,相互契合,并通过细胞的形式共同组织起来,执行着各种复杂生理功能,体现出生命的高级活动。

单细胞生物一个细胞就是一个完整的生命体系。多细胞生物逐渐出现高度分化的器官组织,细胞内不同的细胞器的化学组成也有明显区别。一个细胞究竟有多少生物分子组成呢?现以大肠杆菌为例,说明一个简单的细胞的分子组成。见表 1-1。

表 1-1 可以代表细菌这一类细胞的组成成份的基本情况,当然不同类型的生物、不同

表 1-1 大肠杆菌细胞中主要的分子组成^[2]

组 分	总 量 的 百 分 率	分子 种 类 的 概 数
水	70	1
蛋白质	15	3,000
核酸 DNA RNA	1 6	1,000
糖类	3	50
脂类	2	40
基本单位分子与中间产物	2	500
无机离子	1	12

类型的细胞其组成分子种类和概数是不相同的，有的差异很大，有的差异较小。但在同一个细胞内各类的分子分布大致有一个规律，在真核细胞中，脱氧核糖核酸（DNA）大部分存在于细胞核内，只有极少量存在于线粒体或叶绿体中。而核糖核酸（RNA）则主要存在于细胞质中。电子传递系统组成物质，包括黄素蛋白，细胞色素 c、c₁、a、a₃ 以及糖类分解，脂肪酸合成和氧化，氧化磷酸化等有关酶系大部分存在于线粒体中，关于蛋白质（包括酶）和核酸两大类大分子在细胞内分布情况，现以肝细胞为例介绍于表 1-2^[3]

表 1-2 蛋白质、酶及核酸在肝细胞内分布情况

细胞器名称	主要蛋白质及酶类	核酸类
细胞核	精蛋白、组蛋白、核酸合成酶等	RNA 占总量 10% 左右 DNA 几乎全部
线粒体	电子传递、氧化磷酸化、三羧酸循环、脂肪酸氧化、氨基酸氧化、脲合成等酶系	RNA 占总量 5% 左右 DNA 微量
内质网(微粒体)	蛋白质合成酶系、羟化酶类	RNA 占总量 50% 左右
溶酶体	水解酶系(包括 RNA 酶、DNA 酶、磷酸脂酶、硫酸酯酶、脂酶、组织蛋白酶、糖苷酶等)	
高尔基氏体	糖苷转移酶、粘多糖及类固醇合成酶系	
细胞膜	载体与受体蛋白、抗原 ATP 酶、环化腺苷酶、5'-核苷酸酶以及多种脂蛋白及糖蛋白	
细胞汁	嘧啶和嘌呤代谢物、氨基酸合成酶系、各种可溶性蛋白	RNA(主要是 tRNA)占总量 30%

由上两表可见，一个细胞包含着成千成万种分子，每种分子每时每刻都在变化运动中，就像一座小小的“化工厂”一样，分成许多车间，有着各种各样的机器，不断消耗着各种原料，产生出各种产品；这处产品运到别处又变成了原料，重新合成或分解成另一产品，直到最后变成最简单的 CO₂、尿素、H₂O 或一些“低值”废物排出体外。生化分离制备的目的，就好像是把这一“工厂”里某一机器的“部件”或“产品”巧妙地、毫无损伤地分离出来。研究其结构，了解其功能或作为一种药物和原料满足人类社会生产和生活需要的一种手段。

二、生物分子间的作用力^[4,5]

存在于地壳上的元素已知有九十多钟，而组成生物体的元素不过二十多种，其中最重要的元素是碳。以碳为主链连结氮、氧、氢、磷、硫等元素，通过共价结合，组成各种原始生物小分子的骨架，如氨基酸、核苷酸、单糖、甘油、脂肪酸等。我们把这些原始生物分子看成是生命组成的基本结构单位。然后这些小分子通过共价缩合而成各种各样生物大分子，如蛋白质、酶、核酸、多糖等。大分子与大分子，或大分子与小分子之间又常常相互结合形成更大的复合分子，如脂蛋白、糖蛋白、核蛋白等。蛋白质、核酸等生物大分子除了一级结构外，还有二、三、四级结构。生物大分子还可以再聚合成生物超分子复合物，如核糖体便是一个超分子结构复合物。每个核糖体含有一个大亚基，一个小亚基，每个亚基约含有 65% RNA、35% 蛋白质。各种细胞器实际上是由超分子复合物所组成，最后再由不同结构的细胞器建造成细胞。因此，我们欲把细胞中各种生物分子相互间的结合拆开，就

需要了解这些分子结合的力(或称化学键)的有关性质,然后才能使用相应的措施把它们彼此分离出来,这就是我们生化制备实验设计的主要对象及目的。现在简单地就一些主要生物大分子内及分子之间的作用力讨论如下:

(一) 共价键

这是组成各种生物分子元素及基团之间“连结”主要化学键。共价键又称原子键,是指由两个原子通过共用电子对而产生的一种化学键。若电子对是由两个原子平均共有称为非极性共价键。如电子对偏于某原子一侧使整个分子产生极性,称极性共价键。极性键的极性渐增至电子对脱离一个原子而为另一原子所单独占有时,即变为离子键(如图1-1所示)。因此,离子型化合物是一种极性最强的化合物。

上面所述是由二个原子共同提供电子对所形成共价键,如果两个原子之间,由某一原子单方面提供共用电子对所形成的共价键称为“配位键”。许多含有金属离子的蛋白质分子,金属离子与蛋白质的连接大都是配位键。

蛋白质分子内每一个氨基酸的氨基与另一氨基酸的羧基之间脱水缩合形成肽键,核酸分子内每一个核苷酸的磷酸基团与相邻的另一个核苷酸的戊糖上的羟基脱水缩合形成磷酸二酯键。多糖分子内前后单糖上羟基脱水缩合形成的糖苷键都是共价键。现以蛋白质为例,介绍一些共价键的键长及键能如表1-3。

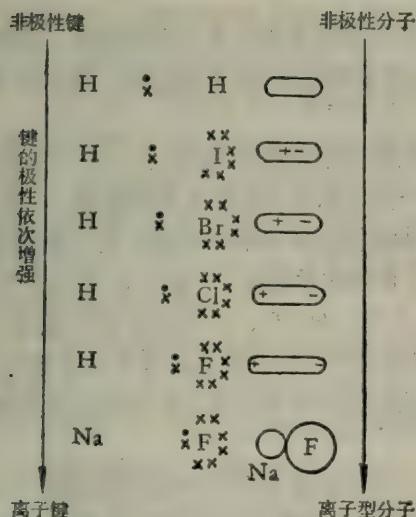


表1-3 蛋白质中共价键键长及键能

共价键	键长(Å)	键能(KJ/克分子)
C—H	1.08	~378.7
C—C	1.53	276.9
C—N	1.47	232.2
C=N	1.30	468.6
C—N(肽键)	1.32	
C—S	1.81	246.8
C=O	1.24	665.2
O—H	0.96	462.7
N—H	1.01	352.7
S—N	1.33	366.9
S—S	2.08	266.9
P—O	1.66	~335.0

图1-1 由非极性分子过渡到离子型分子示意图

1卡(cal)=4.1868焦耳(J)

从表1-3中可以看到,共价键的键能一般在230至660千焦(KJ)之间,其中肽键(-C—N-)与二硫键(-S—S-)都具有双键性质,肽键不能沿着-C—N-轴自由转动,二硫键不能沿着-S—S-轴自由转动。肽键是蛋白质一级结构中主要共价键,二硫键是维系蛋白质空间结构最强有力的桥键。而磷酸酯键则是核酸一级结构的主要共价键。

(二) 非共价键或非共价键作用力

生物体内的生物大分子如蛋白质、酶、核酸、多糖等的空间结构和分子之间的作用力,

主要是通过非共价的静电引力、氢键和范德瓦耳斯力（Van der Waals'）等联系而成。其中除离子键的键能与共价键相近外，其它键的键能一般都小于 40 千焦（KJ），而键长则长达 3—5 Å 左右。组成生物分子共价键的强度、方向或其它性质受环境影响较少，而非共价键的性质受环境影响较大。下面我们分别介绍一些非共价键作用力的性质：

1. 离子键（或称离子对，有时称为盐键或盐桥） 离子键指相反电荷的静电作用力，这一作用力与两个带电基团带电量的乘积成正比，与两个基团距离平方成反比，称为库伦定律，可用下式表示：

$$F = \frac{q_1 q_2}{Dr^2}$$

$q_1 q_2$ 表示二个带电基团的带电量。D 是介电常数，即介质对有相反电荷微粒之间静电引力影响的数值，常定义为在真空中与在介质中这种带电微粒之间的电位差比。 r 为二个基团的距离。

生物大分子能形成离子键的带电基团很多，如蛋白质分子中的带正电基团有胍基、 α -氨基、N-末端的氨基、咪唑基等，带负电的基团有 C-端羧基，天门冬氨酸的 β -羧基，谷氨酸的 γ -羧基等，都可以相互形成离子键。但离子键在水中，因水的介电常数很高，带电基团受屏蔽，从而使正负电荷相吸引的能力大大减弱。所以分布在蛋白质分子表面的带电基团，实际形成离子键的机会并不多，主要是把水分子吸引在自己周围形成水合层，使蛋白质具有亲水性质。

在核酸分子中的磷酸基团有时候也与蛋白质分子中碱性基团以离子键相结合（如组蛋白、核蛋白），另某些酶，如胆碱脂酶、酶分子和底物胆碱的结合，也是通过离子静电引力相互作用的。

2. 氢键 在化合物分子中，凡是和负电性较大的原子相连的氢原子（如 O-H, N-H, F-H）都可以和同一分子或别的分子上另一负电性较大的原子形成氢键。水、乙醇、醋酸等分子的缔合现象和蛋白质、核酸分子立体结构的维系都和氢键有关。氢键的键距比普通的化学键长，约为 2.63 至 3.10 Å。键能比普通化学键弱，一般只有 12—34 千焦/克分子。氢键还具有方向性，当氢键供体与受体上 N、H、O、C 等原子在一直线上时，键的强度最大。约为 33 千焦。在水溶液中，氢键的产生和交换都以很高速度进行。这对生物分子表现其生理活动有着重要的作用，也是生物大分子形成立体构型的主要推动力之一。

3. 范德瓦耳斯力（Van der Waals'） 范德瓦耳斯力主要包括三种弱的静电引力：

(1) 非极性分子内部电子运动的不对称，产生瞬时极性现象，以及由于这一现象所引起周围电子分布的变化所产生的作用力，也称色散效应或 London 分散力。

(2) 极性基团之间偶极与偶极相互吸引力（也称定向效应）。

(3) 非极性分子与极性分子接近，在分子内造成的偶极诱导作用（也称诱导效应）。

范德瓦耳斯力总的表现趋势是偶极之间互相吸引，但当两个基团距离很近时排斥作用又占主导地位。范德瓦耳斯力的键距约为 3—4 Å，其能量比氢键还弱，在水中或一些极性介质中单独起作用不大，但分子中存在许多偶极，这些偶极相互作用所得的范德瓦耳斯力则是很大的。范德瓦耳斯力还具有某些特点，如它一方面可以使分子之间具有吸引能力，同时这种引力又必需使二个分子保持一定距离。这种特殊作用力对于酶和底物，抗

原和抗体的结合和解离有着重大意义。

4. 疏水基相互作用 疏水基相互作用，以往常称为“疏水键”。虽“疏水键”这一词不确，因习惯了现姑用之。它对于维持蛋白质、酶、核酸等大分子立体结构起着重大作用。这些大分子通常都有亲水区域和疏水区域，疏水区域一般位于分子内部，也常是酶与底物，抗原与抗体相互结合的地方。

蛋白质和核酸分子的疏水键主要是蛋白质分子中缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸等一些疏水性基团及核酸分子中嘌呤、嘧啶碱基之间的非极性侧链粘结在一起而形成的。这些非极性疏水基团相互粘合在一起，可以解释为非极性基团为了避开水而被迫相聚的自然趋势。在疏水区域，极性基团一般很难离子化，并造成与自由水溶液十分不同的化学环境。有机溶剂能降低溶液介电常数，故可导致疏水键的破坏，反之，盐类可使非极性基团在水中溶解度减少，可使疏水键增强。

(三) 水在各种非共价作用力中的作用

没有水，生命便不可能形成。在生物化学反应中，水不仅是一种良好的溶剂，也是在各种生化反应中提供 H^+ 和 OH^- 的主要源泉。同时，水还是生物分子表现生理活性的唯一天然环境。水的结构特点及对于生物分子作用力的影响可归纳如下：

(1) 水分子由一个氧原子和两个氢原子组成，由于分子不对称的空间构型，其中氧原子具有负极作用，而相邻的二个氢原子则合成偶极分子中的正极。二个氢原子核与氧原子核连线之间形成的夹角约为 105° ，是一个高度极化的极性分子，具有很高的介电常数，图 1-2 是水分子结构示意图。

(2) 由于偶极分子中场力的作用，水分子彼此吸引而缔合，很少单独存在。每个水分子通过氢键可与另外四个水分子配价，形成四面体“冰格”的结构，随着周围条件的变化，结构中的氢键不断破坏又不断形成，水分子间这种独特结构使水有极高的内聚力。

(3) 水溶液中的水分子因自身形成氢键的趋势极强，故水分子的存在可使其它分子形成氢键能力减弱，水分子还可以减弱离子键的相互作用，而增强非极性疏水键的相互作用。

(4) 通过氢键的缩合作用，许多生物分子如多糖、淀粉、蛋白质、核酸等分子中的羟基或氧、氮等原子都可以通过氢键与水结合，从而具有巨大的水合或称“水化”能力。

上述关于一些生物分子中的结合力及分子间的作用力的简单介绍，可以看到生物体系中分子结构及分子之间联系的作用力十分复杂。作为一个生物分子，其基本骨架各原子及基团之间都是共价结合，整个分子一级结构是比较稳定的。但分子与分子间的连结主要通过一些非共价键如氢键、盐键、金属键、范德瓦耳斯引力所维系，其键能较弱，而且键的性质差别较大，故可采取不同方法使之分离，而不损伤其分子基本结构。但须注意的是许多生物大分子的二、三级立体结构也是一些非共价结合，因此分离时就必须十分小心，使其立体结构不受破坏。故常常保持在十分温和的条件下，以避免由于强烈的外界因

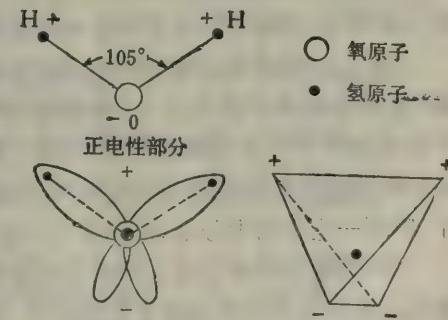


图 1-2 水分子结构示意图

子而丧失其生理活性。这就是生化分离制备技术与有机化学分离制备技术最重要区别之处。

第二节 生化分离制备方法特点及基本原理

一、生化分离制备方法特点

混合物中各组分的分离是化学科学中一个重要内容，但某些经典的化学分离方法如蒸馏、熔炼等，对具有特殊生理活性物质的分离是不适合的。许多生理活性物质如蛋白质、酶、核酸等的分离已给经典的化学分离方法带来了新的课题，并有力地推动了化学分离技术向另一分支——生化分离技术的发展。生化分离技术由实验目的的不同，可分为生化分离分析和生化分离制备二个方面。前者主要对生物内各组份加以分离后进行定性、定量鉴定，它不一定要把某组份从混合物中分离提取出来。而后者则主要是为了获得生物体内某一单纯组份。生化制备技术与一般化学分离制备技术比较，其特点有下列几点：

第一，生物材料组成非常复杂。一个生物材料常包括数百种甚至数千种化合物，各种化合物的形状、大小、分子量和理化性质都各不相同，其中有不少化合物迄今还是未知物质，而且这些化合物在分离时仍不断在代谢变化中。

第二，有些化合物在材料中含量极微。只达万分之一，几十万分之一甚至百万分之一。如从脑垂体组织提取某些激素的释放因子，从蚕体中提取某些信息素，和从竹笋中提取竹笋素等，都是用几吨或几十吨的原料才提取到几个毫克的目的物。

第三，许多具有生物活性的化合物一旦离开了生物体内的环境，很易变性、破坏。因此，在分离过程中要十分小心保护这些化合物的生理活性，这是生化制备最困难的地方，许多生物大分子在分离过程中，过酸、过碱、重金属离子、高温、剧烈的机械作用、强烈的辐射和机体内自身酶的作用均可破坏这些分子的生理活性。故分离具有生物活性的生物分子，特别一些生物大分子，常选择十分温和条件，并尽可能在较低温度和洁静环境下进行。

第四，生化分离方法几乎都在溶液中进行，各种参数(温度、pH值、离子强度等)对溶液中各种组成综合影响常常无法固定，以致许多实验的设计理论性不强，实验结果常常有很大经验成份。因此，一个实验的重复性的建立，从材料到方法直至各种环境条件，使用的试剂药品等都必须严格地加以规定。

第五，为了保护所提取物质的生理活性及结构上的完整，生化分离方法多采取温和的“多阶式”进行，也就是我们常说的“逐层剥皮”方法，一个生物分子的分离制备常常少至几个步骤，多至十几个步骤，并不断变换各种分离方法，才达到纯化目的。“多阶式”的分离制备方法操作时间长，手续繁琐，常常会给制备工作带来许多影响。近年来出现所谓“钓鱼法”，利用某些分子特有的专一亲和力，将某一化合物从极复杂的体系中一次钓出，这一方法目前虽只用于某些大分子如酶、抗体和核酸等的分离提纯工作，但比起任何经典化学方法都具有很大的优越性。

第六，生化分离方法最后均一性的证明与化学上纯度的概念并不完全相同。这里由于生物分子对环境反应十分敏感，结构与功能关系比较复杂，故对其均一性的评定常常是

有条件的，或者只能通过不同角度测定，最后才能给出相对的“均一性”结论。只凭一种方法所得纯度的结论往往是片面的，甚至是错误的。

二、生化分离制备方法基本原理

生化分离方法与一般化学分离方法虽然有着许多不同特点，但生化分离方法与一般化学分离方法原理上又有许多是相同的或者说是相通的地方，这充分说明反映了近世纪来生物化学的发展与经典化学及物理学的密切关系。用于生物化学分离的制备技术，大都根据混合物中的不同组份分配率的差别把它们分配于可用机械方法分离的两个或几个物相中（如有机溶剂抽提、盐析、结晶等）。或者将混合物置于某一物相（大多数是液相）中，外加一定作用力，使各组份分配于不同区域，从而达到分离目的（如电泳、超离心、超滤等）。除了一些小分子如氨基酸、脂肪酸、某些维生素及固醇类外，几乎所有机体中大分子物质都不能融化，也不能蒸发，只限于分配在固相和液相中，

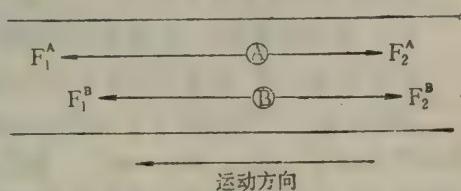


图 1-3 分离时，溶质分子所受的不同作用力示意图

表 1-4 生化分离方法分类表^[6]

分离方法	推动力 F_1	阻滞力 F_2	占优势的作用力	分离主要依据
一、色谱				
(a) 吸附	流体动力	表面能, 范德瓦耳斯力位阻效应	F_2	极性、位阻因素
(b) 离子交换	流体动力	静电吸引力, 极化度分子筛效应	F_2	离子性质及分子大小
(c) 分配	流体动力	渗透(扩散), 偶极作用, 综合和解离效应	F_2	极性因素
(d) 分子筛	流体动力	渗透作用	F_2	分子大小
二、逆流分配	机械作用	渗透, 综合和解离效应	F_2	极性因素
三、电场力				
(a) 在自由溶液中	静电引力	分子摩擦力, 极化度动电作用	F_1	离子性质
(b) 在多孔支持物中	静电引力	分子摩擦力, 极化度动电作用, 表面能	F_1	离子性质
(c) 在凝胶支持物中	静电引力	分子筛效应	F_1 和 F_2	离子性质和分子大小
(d) 等电聚焦	静电引力		平衡作用	离子性质
(e) 对流电泳	静电引力	分子摩擦效应	F_1	离子性质
(Electrophoresis-convection)	电 动 力 (Electrokinetic)			
(f) 电渗析	静电引力	分子筛效应	F_1 和 F_2	分子大小和离子性质
四、扩散方法				
(a) 透析	电 动 力	电动力		
(b) 超滤	渗透力	分子筛效应	F_2	分子大小
(c) 在溶液中热扩散	流体动力 温度梯度 重 力	分子筛效应, 表面能(吸附) 分子摩擦效应	F_2 F_2	分子大小
五、结晶	结晶格子能	扩散	F_1	分子大小及形状
六、沉降				
(a) 动力学的	重力、离心力	分子摩擦效应	F_1	分子大小
(b) 等密度的	离 心 力		平衡作用	分子大小及介质密度

并在这两相之间相互交替进行分离纯化。

摩尔里斯(Morris)认为许多生化分离制备方法都可以看作是各种溶质分子在溶液中沿着一条狭窄路线移动的结果^[6]。例如溶质分子(A)在一定时间内只有一个运动方向,它受二个不同方向力的作用(如图1-3)。

F_1 表示与溶质分子运动方向相同的推动力, F_2 表示与溶质分子运动方向相反的阻滞力。作为推动力可能是流体动力(如色谱)、电场力(如电泳)、重力、离心力(如沉降)及其他作用力如扩散,渗透中的分子运动等。许多分离方法常常不止一种推动力,而是几种推动力联合起作用。阻滞力一般包括:

- (1) 在均一溶液中分子的摩擦效应;
- (2) 极化分子的静电作用,尤其是生物大分子溶质与溶液中其他溶质分子的静电引力,往往造成这些大分子溶质流动时遇到的主要阻碍力。
- (3) 在两相体系中,溶质在两相中的分配系数及分子筛效应等。
- (4) 吸附作用,渗透作用及其他因素所引起的阻滞力。

因此,图1-3中溶质分子A的移动速度取决于 $F_1^A - F_2^A = \Delta F^A$, 而溶质分子B的移动速度取决于 $F_1^B - F_2^B = \Delta F^B$ 。溶质分子A与溶质分子B的分离效果将取决于 $\Delta F^A / \Delta F^B = \Delta F$ 的比值。所以,在分离混合物的各组份中,必须尽量设法扩大各组份之间 ΔF 的差别,以其达到各组份彼此之间的完全分离。

史特朗(Strain)和他的同事根据物质分离各种力的作用把许多分离方法作了一些归纳及评论^[7]。摩尔里斯(Morris)等在史特朗等基础上进一步把各种分离方法中 F_1 、 F_2 及分离时主要依据——物理、化学因素作了小结,如表1-4所示。

表1-4中所列各种生化分离方法,在制备中使用较多的有吸附色谱、离子交换色谱、分子筛色谱、逆流分配、凝胶电泳、电渗析、透析、超滤、结晶、沉降等,其中大部分方法将在以后各章中分别予以介绍。

第三节 生化分离制备实验的设计及实验方法的选择

一、生化分离制备实验的设计

生化分离制备实验的设计,首先面临的是所要求分离的物质的化学结构及性质存在着“已知”与“未知”两种情况。已知结构性质物质的分离制备,前人肯定已做过一些研究,在继续进行这类实验时,常常是为了取得更纯、更多的产物或者希望找出更简便、效率更高的实验方法。因此,这类物质分离制备方法的改进,主要依赖于对所分离物质的理化性质的了解和参照前人已用过的各种实验方案,通过自己具体实验条件加以比较优选,或者是参考其他类似物质最新分离方法加以引进试用,从而求得最佳的实验方法或工艺流程。经较小的制备规模过渡到中间规模试验,最后到较大规模的工业生产。但任何技术方法都有时间性和受到具体条件的限制,一个认为比较理想的分离制备方法,并不是永远都是最好的,随着时间的推移和新的技术、实验仪器和实验器材的出现,总得不断革新,完善;否则便将逐步地被新的方法所代替。所以,熟练掌握实验原理,根据自己实验具体条件,及时了解国内外有关先进技术发展动态,不断改进自己实验方法,才能适应日新月异的技

术发展的要求。

对于一个未知化学结构、性质的物质的分离制备，情况则比较复杂，由于所分离制备物质还是一个“未知数”，没有什么经验和固定方法可以遵循，开始设计实验时，只能根据该物质某一生物学或生物化学的性质或现象来指导每一分离制备步骤（这里，往往也需要参照前人有关工作，并不是凭空想出）。有时在摸索过程中，往往认为自己设计的方法很理想完善了，但最后得不到什么结果或得到很小的结果，这是常有的事。只有经过多次反复实践，不断总结失败原因，修改原有的实践方案，才有可能取得最后成功。当实验一旦获得目的制备物后，就可以根据产品比较详细准确理化性质，改进已有制备方法条件，逐步提高产品的质量和产量。

生物体内某一组份，特别是未知结构的组份的分离制备设计，大致可分为五个基本阶段：

- (1) 确定制备物研究目的及建立相应的分析鉴定方法。
- (2) 制备物物理化学性质稳定性的预备试验。
- (3) 材料处理及抽提方法的选择。
- (4) 分离纯化方法的摸索。
- (5) 获得制备物以后，均一性的测定。

现就以上五个基本阶段所涉及的实验设计原理及实验程序简要介绍和讨论如下：

（一）制备物研究的目的及分析鉴定方法的建立

前已提到，分离制备某一生物组份的目的，如果不是为了在原有的实验方法上加以改进，以求得更多更纯的产品，就是为了获得新的物质。这里主要涉及的问题是后一种情况。在生物化学研究工作中，新组份的分离常常是科研工作主要内容。机体内一个新的物质的发现，对了解有机体的生理功能具有很重要的意义。如核酸的发现对揭开生物体遗传变异规律之谜，环化腺一磷的发现对进一步了解激素和代谢调节的关系，反向转录酶的发现对于了解 RNA 控制蛋白质的合成等。可以说生物体内每一种新的物质的发现，都不同程度地推动着生物化学甚至整个分子生物学前进一步。通过科学工作者的长期劳动，现在我们虽然知道了很多机体内组成成份及分泌的物质，但也许我们尚未知道的东西比已知的东西数量还要多。从生物不断变异的观点来看，人们对机体内组成的物质的认识是没有尽头的。

从机体内分离制备一种未知物质的企图，通常是由于二种情况引起的。一种是无意识的，例如，在进行某种有目的的实验时，偶然出现了某些异常现象，引起了研究人员的注意和兴趣，从而进一步去追踪研究。属于这类情况往往在研究者获得了这种制备物质后，开始并不了解这种物质的生理意义或实际上有什么用处。只有经过一定时间后才被人们所认识。这种开始并没有固定目的的实验工作，对于应用研究部门往往容易疏忽或缺乏深入探索的兴趣。基础理论研究部门则常视为一种新的发现，而比较重视加以研究。第二种情况是有目的的，人们在一定自然条件或人工条件观察到某种异常的生物学或生物化学现象，从而有意识地追踪研究引起这种现象发生的物质基础。这种例子在科研工作中是很多的。如根据细菌生长被抑制的情况有目的分离某种新的抗菌素，根据某些物质对动、植物的代谢调节所引起的作用探求新的激素，根据昆虫某些特殊生理反应研究它们所

分泌的通讯物质，以及从机体内某种代谢中间产物的积累寻找催化这一反应的酶等等。属于这类有既定目的而设计的分离制备实验方案，效果一般比较显著。建立相应的分析鉴定方法也比较容易，获得制备物后对其生理意义及实用价值事前也已有一定的认识。

生化分离制备实验目的性尽管有不同，当一旦着手进行实验工作时，都必须首先建立对制备物的分析鉴定方法，才能保证分离制备工作顺利进行，指导生化物质分离制备工作的分析鉴定方法大致可分为三种类型：

1. 生物测定方法 对一个未知结构的新物质，生物测定方法常常比一般物理化学方法具有更大优越性，且是实验取得成功必不可少的一步，生物测定方法全面涉及生物学各科的实验内容，如微生物学、细胞学、生理学、组织解剖学、药理学及动植物形态分类学等。一个生物测定方法的建立，必须选择适当的生物对象，继而决定测试的生物反应类型，如细菌的生长或抑制，肌肉的舒张或收缩，某种器官呈现抑制或兴奋反应，血压的升高或降低，受到试验物质刺激后某种组织分泌物增加或减少等。然后在这些定性反应基础上进一步建立生物反应的定量标准。生物测定方法很多，而且每一测定方法具体规定标准及条件各不相同，其详细内容的介绍可参看有关专著及资料^[3,8]。

2. 理化测定方法 这是最常用最方便的分析测定方法，生物测定方法虽有很高特异性，但手续繁琐，对于指导分离制备实验的进行，时间上太受限制。因此，对于一个未知化学结构的物质，如生物反应测定确定其存在后，应立即着手建立理化测定方法。理化测定方法的建立一般是先进行预试，初步肯定该物质属于那一类有机物，然后按各类有机物质的特殊物理化学性质建立定性、定量鉴定方法，这类方法常有：

- (1) 呈色法：包括染色和比色法。
- (2) 色谱法：包括纸上色谱、薄层色谱、气相色谱和高效液相色谱等。
- (3) 光谱法：包括紫外光谱、红外光谱、荧光光谱等。
- (4) 电泳法：包括纸电泳，凝胶电泳等。
- (5) 核磁共振波谱法。
- (6) 其他：如电子显微镜观察。

理化测定方法的最大优点是实验操作简便快速，能及时指导分离制备工作。

3. 理化方法与生物学方法结合测定 对于某些生物体内含量较低，或所建立的理化测定方法的特异性和灵敏度不足以反映该物质定性与定量的要求时，常需要结合生物学测定方法才能全面地准确地反映该物质的存在情况。例如 Kaslson 和 Schmialak 根据生物反应知道虾也存在蜕皮激素并借用昆虫中提取蜕皮酮的方法企图从虾提取这种物质，由于使用的理化分析方法不够灵敏和分离流程的不合理，用了三千公斤虾为实验材料而毫无所获。后来 Hampshire 和 Horn 以丽蝇 (Calliphora) 的生物测定为指导，并结合理化分析方法，改进了实验分离流程，才由一千公斤虾的废液中成功地分离了 2mg 非结晶的蜕皮酮激素；又如从家蚕中提取家蚕醇，使用气相层析方法和蚕蛾兴奋反应相结合，使分离制备流程效果大大提高。

理化分析方法与生物学测定方法相结合，用于各类抗菌素、信息素、激素、维生素和各种具有生理活性的生化药物的定性及定量相当普遍。

不论是生物学方法或物理化学方法或是二者结合使用，一个好的分析鉴定方法必须满足以下要求：

1. 特异性或专一性强；
2. 重现性好；
3. 准确度大；
4. 灵敏度高；
5. 手续简便；

分析方法的特异性或专一性，对于整个分离纯化实验的成功与否非常重要。一个特异性高的分析方法的建立是分离一个未知结构的化合物的指南针，如果分析方法特异性不高，分离工作前进方向不明，必然造成错误的结果。一个分析方法的特异性能除了方法本身因素外，与环境因子关系十分密切。特别在分离纯化初始阶段，各种干扰物质大量存在情况下，一个专一性高的分析方法更显得重要，但除了极个别情况外，很少有绝对专一的分析方法。所以为了提高分析方法的特异性，常常需要把起始材料中干扰成份减少到最低量，或尽量选择适当条件使干扰物质不起作用。选用制备物质含量较丰富的材料，也可大大提高分析方法的特异性。

重现性或称重复性，是指分析结果能经受时间的考验重复测出的程度。重现性的获得主要是认真规定每次的实验条件，包括分析仪器装置，试剂药品的标准度，样品的浓度，操作方法及材料的来源、保存和处理等。如果把样品、测试仪器、试剂等因素固定后，分析方法的重现性，主要和实验人员主观因素有关。

分析方法的准确度主要反映在定量测定上的误差范围。在一般情况下对分析方法要求的准确度当然越高越好，但在生化制备过程中，制备物由一个混杂体系逐步向一个纯粹单一的物质过渡，开始时杂质的干扰是不可避免的，因此，分离提纯每一阶段，定量上存在的误差只要不影响分离提纯工作沿着正确方向进行，即可满足测定要求。有的分析的精确度甚至可以粗略到用正反应(+)或负反应(-)表示，也能获得很好分离效果。所以在分离制备过程中，分析工作的特异性和重现性在某种意义上比要求精确度更为重要一些。

灵敏度是指制备物在某一体系中含量的可测度。换句话说，即我们使用的分析方法对制备物所能测出的最低含量是多少。在分离纯化开始阶段或所用原料含制备物的量较低时，高灵敏度的分析方法显得比较重要些。此外，高灵敏度的分析方法在多步骤的分离提纯工艺流程中，可以帮助收回一部分产品，达到节省原料消耗，增加产量的目的。

最后谈谈分析工作操作手续的繁简与指导分离纯化实验的关系，人们往往存在这样一个倾向，即盲目追求某一分析方法的特异性或灵敏度等指标，而忽视操作手续简便的重要性，这对于一些代谢速度较快或者容易失去生理活性的物质的制备，将是一严重的错误。生化分子一般都是一些具有生理活性的物质或代谢的中间产物，因此，简便快速的分析测定方法有着重要意义。人们在提取一个代谢速度较快的中间产物时，往往宁愿要一个快速简便而精确度较差的方法，而不要一个繁琐费时而高精确的方法，这似乎是一个普通的原则。

(二) 制备物的物理化学性质及稳定性的预备试验^[6,9]

制备物的理化性质及稳定性的预试验是对一个未知物质分离制备实验设计的基础。许多生化物质在有机体特定环境中比较稳定，一旦离开机体后容易受外界条件影响而失活。因此，在各个阶段的分离纯化步骤中，都必须在制备物的稳定条件范围内进行，以保

证被分离物质不受破坏。设计一个未知结构的生化物质的分离纯化实验方案，通常所涉及的预备试验项目如表 1-5 所示：

表 1-5 分离制备物质的预备试验项目表

A:	溶解性能
1.	在水或各种稀盐溶液中的溶解性能；
2.	在弱极性溶剂中溶解性能(如甲醇、乙醇、丙酮等)；
3.	在各种非极性溶剂中的溶解性能(如氯仿和各种烃类等)。
B:	溶液稳定性
1.	pH 稳定范围；
2.	温度效应；
3.	各种缓冲溶液的影响；
4.	有机溶剂(如乙醇、丙酮)的影响。
C:	固态时稳定性
1.	温度影响；
2.	水份含量的影响；
3.	低压冻干效应。
D:	物理性质
1.	透过不同大小孔径膜的能力；
2.	在固体上的吸附作用；
3.	在电场中每一 pH 变化的迁移值；
4.	在超离心力场中的沉降作用。
E:	化学性质：
1.	对胰蛋白酶及其他蛋白水解酶作用的稳定性；
2.	对 DNase 和 RNase 作用的稳定性；
3.	对糖类分解酶作用的稳定性；
4.	在温和条件下乙酰化作用的稳定性；
5.	对亚硝酸作用的稳定性；
6.	在温和条件下酯化作用的稳定性。

表中所列项目较繁多，不必在实验一开始便全部进行试验，先选择某些预试项目，其结果能说明一个未知物的主要物理、化学性质就够了。例如未知物是极性还是非极性化合物，是电解质还是非电解质，是大分子还是小分子及 pH 值、温度、稳定范围等。至于其他一些细目，往往需要结合分离制备过程出现的具体情况，有必要时，才进一步加以测试。

在上表所列到各预测项目中，溶解性能的测定是指导制备物的提取、沉淀、结晶的基础。必须最先完成，然后在此基础上，求出 pH 值、温度、离子强度对制备物溶解度及稳定性的影响，以便在溶液中找出最适提纯条件。对于绝大多数生化物质来说，只有在一定 pH 值、温度及离子强度下进行分离纯化才能保证其活性不受损失，这方面内容在本书以后几章中还详细讨论，在这里需要指出的是制备物在分离过程中，随着其他成份不断被除去，原来 B 项试验有关的化学性质将有所改变，这点应随时予以注意。

物理性质的试验主要了解制备物的分子大小、形状及带电性质。在电场中可逆移动的方向及进行离子交换树脂或离子交换纤维素的试验，可判断此未知物是否属于两性电解质及其带电荷性质与数量情况。其次进行某些吸附试验（如活性炭、硅胶、氧化铝、磷酸钙等的吸附试验）可以帮助分离初期制备物在选择方法上的设计。吸附作用可起到浓缩收集作用，但注意活性炭和硅胶的吸附作用不适宜蛋白质及核酸衍生物，因为活性炭和硅胶对这些物质的吸附常常是不可逆的，不仅洗脱困难，而且容易造成变性失活。膜透

性、分子筛层析及超离心沉降作用的试验，主要是为了获得制备物分子大小及形状的证据，在制备中后期的提纯是十分有用的。但这种试验只待分离工作到了一定程度后才按需要进行。到了分离纯化的后期，半成品和成品保存的温度及水份含量对其稳定性的影响也很重要，大多数生化物质固相保存都要低温、干燥（但也不是温度越低、含水量越少越好）还有些生化物质除了对温度含水量敏感外，对光线、气体及某些微量金属也十分敏感。分离后期的产品如以液态保存，影响其稳定性因素更多，更不可有所忽视，否则辛苦制得的样品最后受到破坏或损失是令人痛心的。各种样品的保存方法在本书最后一章还将详细讨论。

分离制备物如果是一复合成分，或某制备物的生理活性与分子内某一基团或分子外某一辅基有关，则其他一些预备试验便不能获得正确的结果。此时常将复合物拆离，决定其中那一组份是所要制备的部分。有些蛋白质和酶，其生理活性与分子上某一氨基、羧基或羟基有关，在温和条件下进行硝化，乙酰化及酯化试验，便可推测这些分子大致化学性质。还有些酶，其生理活性与金属离子和小分子辅基有关，常用透析或超离心沉降方法，观察其失活及重组后复活的过程，便从中了解到整个复合分子中各组份的关系。

总之，在整个实验的设计时，对制备物各项稳定性及一些理化性质的预试验是整个研究工作最费精力及时间的部分，但也是不可缺少的部分。

（三）材料处理及提取方法的选择

选择材料主要根据实验的目的而定，同一种物质由于进化的关系通常在不同种类的生物体中都有存在。从工业生产角度上来考虑，首先是材料来源丰富，含量高、成本低。有时材料来源丰富但含量不高，或者材料来源，含量都很理想，而材料中杂质太多，分离纯化手续十分繁琐，以致影响质量和收率，反不如含量低些但易于操作获得纯品者。因此，必须根据具体情况，抓住主要矛盾而决定取舍。但为了科学实验某种特殊需要，例如对某种材料或某一生物品种中寻找某种未知物质，选材时则无需全面考虑上述问题，只能达到实验目的即可。

与无机物不同，生物体内某种成份不是一成不变的。如植物材料所含各种成份常随季节和生长时期而变化，动物材料中的各种组份处于不同生理状态也有很大差别。微生物材料中的各种组份的变化受环境因子影响尤为显著，培养基的成份、pH、温度的影响外；诱导物、抑制剂的添加都可以大大增加所需物质的含量。菌种的筛选、诱变已是人们所熟悉的提高微生物体内某种物质含量最常用的方法。此外，近年来使用转导、核酸重组即遗传工程等新方法已使细菌中一些原来含量很少的物质大量增加，原来没有的物质成份，也可以通过遗传工程方法，使之产生。当然后者不属于材料选择讨论范围，但这些都说明生物材料所含的组分并不是一成不变的，必须因时因地和根据实验的目的要求而具体解决。一个材料选择是否合理，不仅关系到实验进行的难易，而且常常是导致实验的成败的原因。

实验材料选定后，常常需要进行预处理，如动物材料要除去一些与实验无关甚至有妨碍的结缔组织，脂肪组织和血污等，植物种子需要除壳，微生物材料需将菌体和发酵液分开等。材料处理及洗净以后，下一步就是选用适当方法将组织细胞破碎，进行抽提。材料

中被制备物质的存在形式及部位与组织破碎及抽提方法有直接关系，必须在实验前有所了解。如属体液、血液中的游离物质或生物体分泌到体外的分泌物，则不必进行组织细胞的破碎。但细胞内含物不论存在于哪些部位（如在膜上，核中或细胞浆内）均需采取不同方法进行细胞破碎。

组织细胞的破碎方法很多，有机械方法，物理方法，化学及生物化学方法等。不同实验规模，不同实验材料和实验要求，使用的破碎方法和条件也不同。例如一些坚韧组织如肌肉，植物的根、茎等，则常需强烈的绞碎或研磨作用，才能把其组织细胞破坏。而比较柔软的组织如肝、脑等，用普通的玻璃匀浆器即可达到完全破坏细胞的目的。同样一种实验材料，但制备大分子量的核酸和制备小分子的核苷酸，对细胞破碎的方法和条件也不相同，后者可以采用强烈手段，而前者则必须保持十分温和的条件，才不致于损坏其分子的完整性。组织细胞破碎常用方法有如下几种：

1. 机械法 主要通过机械切力的作用使组织细胞破碎的方法，常用的器械有组织捣碎机，匀浆器，研钵和研磨、压榨器等。

(1) 组织捣碎机：一般用于动物组织，植物肉质种子，柔嫩的叶，芽等材料的破碎。国产的捣碎机最高转速可达每分钟1—2万转。由于旋转刀片的机械切力很大，制备一些较大分子如核酸则很少使用。

(2) 匀浆器：匀浆器的研杵磨球和玻璃管内壁之间间隙常保持在十分之几毫米距离。破碎细胞的程度比组织捣碎机高。制作匀浆器的材料，除玻璃外，还可以用硬质塑料，不锈钢、人造荧光树脂等制成。

(3) 研磨：多用于细菌或其他坚硬植物材料，研磨时常加入少量石英砂，玻璃粉或其他研磨剂，以提高研磨效果。细菌磨是一种改良了的研磨器，比一般研钵具有更大的研磨面积，而且底部有出口。操作时先把细菌和研磨粉调成糊状，每次加入磨内一小勺，研磨20—30秒钟即可将细菌细胞完全破碎。

(4) 其他大型细胞破碎器：如 French 压榨器 Manton-gaulin 匀浆器等，主要是高压下使细胞通过小孔隙而被挤碎，每小时可处理数十升至数千升样品，适用于微生物发酵工业生产。

2. 物理法 主要通过各种物理因素使组织细胞破碎的方法。在生化制备中常用的有：

(1) 反复冻融法：先将样品深冷至-15℃至-20℃使之冻固，再缓慢地融化，反复多次可将大部分细胞破碎，此法多用于动物性材料。

(2) 急热骤冷法：将样品材料投入沸水，维持85—90℃数分钟后，置冰浴中急速冷却，使细胞壁结构受到破坏。此法可用于细菌及病毒材料，但制备对热敏感的物质时慎用。

(3) 超声波处理：此法多用于微生物材料，频率一般选在10KC至200KC，功率200—500瓦范围，对于不同细菌，应视具体情况而定。处理时间有数分钟至数十分钟不等。处理效果和样品浓度及使用功率有关。在处理过程中如溶液温度升高时，注意冷却。

3. 化学及生物化学法 主要有自溶法，酶解法和表面活性剂处理法等。

(1) 自溶法：自溶法是在一定的pH和适当的温度下，利用组织细胞内自身的酶系统将细胞破碎的方法。自溶法所需时间较长，常添加少量防腐剂如甲苯、氯仿等防止细菌

的污染。

(2) 酶解法：利用各种水解酶如溶菌酶、纤维素酶、“蜗牛”酶、半纤维素酶、壳糖酶、脂酶等专一性地将细胞壁分解，使细胞内含物释放出来。适用于制备大分子核酸材料的破壁。有些细菌对溶菌酶不敏感，加入少量巯基试剂或8M脲素处理后，使转为对溶菌酶敏感而融溶。

(3) 表面活性剂处理：如十二烷基硫酸钠、氯化十二烷基吡啶，去氧胆酸钠等均对细胞膜有一定破坏作用。

此外，使用真空干燥及冷丙酮处理制成“丙酮粉”均可以改变细胞的透性，不同程度地破坏细胞膜结构，以利于提取。

有时为了防止其他细胞组份中的物质对制备物干扰或污染，或由于对细胞组分上某一物质进行特殊研究的需要，常将各种细胞器先行分离，然后在某一细胞器中提纯某一物质。细胞组份的分离，一般使用差速离心法，即将破碎后的细胞在适当介质中进行离心。常用的介质有生理盐水，蔗糖或葡萄糖-聚乙二醇等高分子溶液。各种细胞组份按照质量、大小不同，经过不同速度的离心后，便沉降于离心管不同部位，经过多次分步离心分离，即可获得所需要组份。

组织细胞破碎过程中，大量胞内酶及细胞内含物被释放出来，须立即选择适当条件进行提取分离，避免因长久放置造成制备物的分解破坏。

提取是分离纯化的第一步，它将制备物从复杂的生物体系中转移到特定的人工液相体系中（通常是水、缓冲液，稀盐溶液或有机溶剂）。提取所用溶剂的选择标准首先对被制备物具有最大溶解度，并在提取中应尽可能减少一些不必要的成份。为了更好地达到以上两个目的，常用的手段是调整溶剂的pH值、离子强度、溶剂成份配比和温度范围等。关于提取方法本书第二章另有详细介绍，这里不再赘述。

表 1-6 供选择分离某些生物分子的方法时参考

化合物	技术									
	分配纸色谱	吸附薄层色谱	吸附柱色谱	通透色谱	气-液色谱	逆流分溶	离子交换	亲和色谱	电泳	超速离心
氨基酸	+	++	-	-	++	++	+++	-	++	-
多肽	+	++	-	+	-	++	++	+	++	-
蛋白质	-	-	-	+++	-	+	+	+++ ¹⁾	+++	+++
嘌呤/嘧啶	+	++	-	-	-	+	+++	-	++	-
核酸	-	+	-	++	-	++	+	+++ ¹⁾	+	+++
单糖和二糖	++	++	+	-	++	-	+	-	+	-
寡聚糖和多聚糖	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	++
脂肪酸	+	++	+	-	++	-	-	-	-	-
磷酯	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-
萜类、胡萝卜素 叶绿素	+	+++	+++	-	+	+	-	-	+	-
固醇和类固醇	-	++	++	-	+++	+++	-	-	-	-

1) 可以使用的情况下，+，-表示选择适宜程度。（+）示适宜、（++）较适宜、（+++）最适宜；（-）示不适宜。

(四) 分离纯化方法的摸索

分离纯化是整个生化制备过程的核心部分。生物体的组成成份千千万万种，分离纯化的实验方案也千变万化。没有一种分离纯化方法可适用于所有物质的分离纯化，一种物质也不可能只有一种分离纯化方法。所以对于某一种物质，究竟选用什么分离纯化方法最理想，主要是根据该物质的物理化学性质和具体实验条件而定。认真参考借鉴前人经验可以避免许多盲目性，节省实验摸索时间。即使是分离一个新的未知组份，根据分析和预试验的初步结果，参考别人对类似物质分离纯化经验，也可以帮助少走些弯路。威廉斯 (Williams) 和威尔逊 (Wilson) 等根据一般规律性对各种分离纯化方法适用于什么物质的作用，提出了很好的意见，(详见表1-6)^[10] 摩尔里斯 (Morris) 等对于各种分离方法中所依据溶质的物理化学性质，作了一个分类表(见表 1-7)^[6] 均可供读者参考。

表 1-7 以溶质物理性质为基础的各种分离方法

方 法	分子大小	分子电荷	分 子 相 互 作 用	
			氢键结合	疏水键结合
色谱				
吸附	+	+	+++	+++
分配	+	++	+++	+++
离子交换树脂	+++	+++	-	+
多聚糖	±	±±	+	-
分子筛	+++	+	+	±
气相	+	++	+++	+++
逆流分配	+	++	+++	+++
电泳				
自由溶液	++	+++	-	-
聚丙烯介质	++	++	-	-
纤维素	++	+++	+	-
凝胶	+++	+++	±	±
等电聚焦	±	+++	-	-
沉降	+++	+	-	±
膜穿透(透析)和扩散	+++	++	±	±
溶解度	+	++	+++	+++

二、分离纯化各阶段对实验技术的选择

这是一个十分灵活掌握而且难以统一规定的问题，但是也不是说没有一点规律可循。现根据文献介绍的经验和一般原则，对分离纯化各阶段对各种方法的选择作简单的讨论：

(一) 分离纯化的早期使用方法的选择

分离纯化的早期，由于提取液中的物质十分复杂，制备物质浓度较稀，在理化性质上与被制备物相似的杂质，数量较多。因此在这一阶段选用一些分辨能力较高的分离纯化方法一般认为不大合适。原因是一种高分辨率的分离纯化方法在大量杂质存在下，不论是根据物质分子大小或物质带电性质而进行分离，都不可能使被分离的物质集中于一个

区域。只可能在预定区域中得到一些理化性质相近的同类物，而把真正要分离的成份漏掉。出现这种现象的主要原因，是高分辨率的分离方法在杂质多的情况下位置效应比较严重，大批理化性质相近的分子在相同分离条件下，彼此在电场中或力场中相竞占据某一位置。这样，被目的物占据的机会就很少，或者分散在一个很长区域中而无法集中于一点。高分辨效力的分离方法大部分是根据物质二个以上理化因素而建立的，如区带电泳和凝胶电泳是根据分子大小及带电数量而进行分离的，一次分离物质的量不大，即负荷能力都比较小。如电泳法虽有较高分离能力，但如果早期使用电泳法，不仅得不到理想效果而且掺杂着大量类似物，给以后纯化工作带来更大困难。

早期分离纯化用萃取、沉淀、吸附等一些分辨力低的方法比较有利。这些方法不仅负荷能力大，一次分离的量多，同时可以除去大部分理化性质相差较大的杂质。萃取、沉淀、吸附分离方法既起着分离提纯的作用，又起着浓缩的作用，可为以后进一步分离纯化创造良好的基础。

离子交换树脂分离有时也用于早期纯化，如搅拌交换或短胖柱交换方法用于发酵液中分离浓缩抗菌素比较常见。纤维素离子交换色谱也常直接用于粗抽提液中进行多种蛋白质的制备，没有出现明显的同位效应，且具有较高的负荷能力。其中的 DEAE-纤维素特别适于从中性或碱性蛋白质中分离纯化酸性蛋白质。实验时，先将上柱液调到 pH 4.0~4.5。通过 DEAE-纤维素柱时，酸性蛋白质被吸附，其他杂质及非酸性蛋白质不被吸附，从下面流出。然后进行洗脱和浓缩，这样一步分离后得到的酸性蛋白质纯度可提高许多倍。据 A. Atkinson 报道，早期使用 DEAE-纤维素、羟基磷灰石，从 *B. Stearothermophilus* 菌体细胞提取液中，同时分离了十多种酶，已达到了工业生产规模水平^[11]。

亲合色谱法由于具有极高生物特异性，分离目的物受到理化性质相似的杂质干扰极少，能从比较复杂的组织抽提液或细菌发酵液中一步提取分离出所需的物质，提纯倍数可达一百倍以上。如从大肠杆菌粗抽提液中一步提纯 β -半乳糖苷酶，即达电泳纯^[12]。亲合色谱是一种既优越又简便的方法。用于早期分离一些含量少而又不稳定的生物大分子是一个值得推广的方法。

总的来说，早期分离提纯的方法，选择的原则一般是从低分辨能力到高分辨能力，而且负荷量较大为合适。但随着许多新技术的建立，一个特异性方法其分辨能力越高，便意味着提纯步骤的简化，提纯步骤的减少，回收率便越高，具有生理活性物质变性的危险性就越少，这是所有生化制备研究工作人员所希望的。如上述亲和层析和纤维素离子交换色谱就是很好的例子。其他方法如连续流动电泳，连续流动等电聚焦等，在一定条件下，用于早期从粗抽提液中分离制备小量物质也具有许多优点，但目前仍处于探索发展阶段，不如前两者已达到比较成熟的程度。当然所谓低分辨能力的分离纯化方法如有机溶剂沉淀、盐析、有机溶剂萃取等也不限于分离的早期使用，在整个分离制备过程中经常反复应用，而每次应用其分离的能力和效果也是不同的。

(二) 各种分离纯化方法的使用程序

生物体内各种物质的分离都是在液相中进行的。故分离方法常根据这些物质的分配系数、分子量大小、离子电荷性质及数量和外加环境条件的差别等因素构成不同分离方法的基础。而每一种分离方法又都在特定条件下发挥作用的。因此，在相同或相似的条

件下连续作用同一种分离方法就不大适宜。例如纯化某一两性物质时，前一步已利用该物质阴离子的性质，使用了阴离子交换色谱分离方法，那么下一步提纯时应用阳离子交换色谱或作为一个阳离子应用电泳方法分离，则比再用其阴离子性质作色谱或电泳具有更好的分离效果。各种分离方法的交叉使用对于除去大量理化性质相近的杂质也较为有效。某些杂质在各种条件下带电性质可能与制备物相似，但分子大小与形状与制备物相差较大；而另一些杂质的分子大小形状可能与制备物相似，但在某种条件下与制备物带电性质不同。在这样的情况下，先用分子筛、超速离心沉降或膜过滤方法除去分子量相差较大的杂质，然后在一定 pH 值和离子强度范围下使制备物变成有利的离子状态，便能有效地进行色谱分离。当然，这两种步骤的先后秩序反过来应用也会得到同样效果。

纯化方法顺序先后的安排，还考虑到有利于减少工序，提高效率。如在盐析法后采取吸附法，必然因为盐离子过多影响吸附效果。中间增加透析脱盐一步，则使操作大大复杂化。如倒过来先吸附，后盐析，吸附洗脱时的含盐洗脱液即可直接进行盐析，则可达到操作简化节省原料时间的目的。此外，分离体积过大时使用盐析法和有机溶剂沉淀法都能达到浓缩效果，但使用盐析法成本就低得多。

对于一未知物通过各种方法的交叉分离纯化，还可以进一步了解到制备物的性质，以补充预试验时所获得的知识片面性。但不论是已知物或未知物，当条件改变时，连续使用同一分离是允许的，如分级盐析和分级有机溶剂沉淀等。分离纯化中期，有时由于某种原因（如样品含盐太多，或含量过大等），一个方法一次分离效果不理想，可以连续使用二次，这种情况在凝胶过滤、DEAE-纤维素色谱等比较常见。当分离纯化工作已进行至后期时，大部分杂质已经除去，欲制备的物质已十分集中，重复应用先几步所应用的方法，对进一步肯定所制备的物质在分离过程中其理化性质有无变化和验证所得的制备物是否属于矫作物又有着新的意义。

（三）分离纯化后期的保护性措施

各种活性物质在生物体内的含量一般都是很少的。有的本来含量已经是十分微量，再由于多步骤的纯化过程的流失，到了分离制备后期可获的产品已经是十分微量了，有的量只有原材料的千分之几。有的只有万分之几，或几十万分之几。如果所制备的物质是未知物质，分离纯化方法还属于探索性质，分离过程中损失更为严重。现在数学上作一简单推算：假设某材料含 A 物质为万分之一。纯化后回收率只有 20%，即在分离过程中损失了百分之八十（这是常有的），如开始投料为一千公斤，应得产品是 20 克，到了分离后期，损失了一克产品，就等于损失了五十公斤的原料。因此，到了分离工作后期，必需注意避免产品的损失。后期产品的损失主要途径有玻璃器皿的吸附。操作过程样品液体的残留，空气的氧化和某些事先无法了解的因素，当然后者是很难避免的。所以对于一些探索性的制备实验，为了取得一定量（那怕是很少也好）的产品，提供分析鉴定之用，常常需要加大原材料的用量，并在后期纯化工序中注意保持样品溶液较高浓度，以防止制备物在稀溶液的变性，有时常加入一些电解质以保护生化物质的活性，减少样品溶液在器皿中的残留量等，这些都是十分重要的。

（四）对分离纯化每一步骤方法的优劣进行综合评价

每一个分离纯化步骤方法的好坏，除了从分辨本领和重现性二方面考虑外，还注意方法本身的回收率的高低，特别是制备某些含量很少的物质时，回收率的高低十分重要。表1-8是分离制备的几种常用方法中有关分辨本领、重现性及回收率的一些初步评价（参考Morris并有所删减）^[6]。按现代生化制备中应用的分离纯化方法，一个制备的原始活力经过五至六步的提纯后，一般都可以达到25%以上的回收率。当然，不同物质由于其稳定性的不同及分离的难易，所得回收率是不同的。

表1-8 一些常用的分离纯化方法的几项特性

方 法	分辨本领	重现性	回收率
色谱法：一 吸附	+++	+	+
分配	++	++	++
离子交换	+++	+++	++
分子筛	+	+++	+++
逆流分配法	++	++	++
电泳法：一 自由溶液	+	+++	+++
聚丙烯支持物	++	++	+++
纤维支持物	+++	+++	++
凝胶	+++	+++	+
等电聚焦	+++	+++	+++
沉降法	+	++	+++
膜透析及扩散法	++	+++	+++
溶解度法	+	++	++

生化物质在分级分离中对每一步骤方法的优劣的记录，常体现在所得产品重量及活性平衡关系上。这一关系，可通过每一步骤的分析鉴定即可求出。例如酶的分离纯化每一步骤产物重量与活性关系，通过测定酶的比活力及溶液中蛋白质浓度的比例，其他活性物质也可通过测定总活性的变化与样品浓度或体积作比较而求出。最后根据各步骤所得样品重量或体积和测出的活力列表进行对比分析，算出每步的提纯倍数及回收率。现以从长春花 (*Catharanthus roseus*) 中提纯 Strictosidine 合成酶的实验为例^[13]，将各步骤提纯倍数及回收率总结于表1-9。

表1-9 长春花中 Strictosidine 合成酶的提纯

步 骤	总蛋白 (毫克)	比活性* nKat/毫克蛋白	总活力单位 (nKat)	产 率 %	提纯倍数
(I) 粗抽提液	654	0.008	5.2	100	1
(II) 硫酸铵沉淀	466	0.011	5.1	98	1.3
(III) DEAE-纤维素柱	38.7	0.10	3.9	75	12.5
(IV) 羟基磷灰石柱	5.9	0.64	3.8	73	80
(V) Sephadex G 75	0.72	2.8	2.0	38	350
(VI) 等电焦点	0.08	5.9	0.5	10	737.5

* 比活性项中 nKat 的换算方法见下。

按国际酶学会议规定：一分钟转化一个微克分子底物为一个国际单位酶量，而一个国际单位酶量 = 16.67nKat。原酶量单位“Katal”定义为每秒钟转化一个克分子底物的酶量，因所需酶量太大，现一般很少应用。

上面表中：比活力——总活力除以总蛋白质含量(或蛋白氮)的比值。

回收率——为本步骤所得的总活力与第一步骤所得总活力之比值，以百分比表示，开始时回收率假定为 100%。

提纯倍数——为本步骤所得之比活力与第一步骤所得之比活力之比值，开始时假定提纯倍数为 1。

从表 1-9 的内容中可以看到提纯倍数为 737.5，但回收率只有 10%，即 90% 损失于操作中。总蛋白量由 654 毫克减少至 0.08 毫克，共减少了八千倍，而酶损失仅 10 倍，因而获得了纯化。从每一纯化步骤看，比活力越高，酶的提纯倍数越大，一个好的分离提纯方法应该是提纯倍数和回收率都同时有较大的提高。但必须指出，整个分离提纯步骤是连续进行的，前一步骤虽然提纯程度和回收率都不高，但它是必需的，前一步主要为后一步提供更有利的分离纯化的基础。

(五) 对制备物均一性的鉴定

对制备物均一性的鉴定是分离制备过程最后一个工序，一个新分离的物质是否纯，常用“均一性”表示，均一性即指所获得的制备物只具有一种完全相同的成份。均一性的评价常须经过数种方法的验证才能肯定。有时某一种测定方法认为该物质是均一的，但另一种测定方法却可把它分成二个甚至更多的组份，这就说明前一种鉴定方法所得的结果是片面的。如果某一物质所具有的物理、化学各方面性质经过几种高灵敏度方法的鉴定都是均一的，那么大致可以认为它是均一的。当然，随着新的鉴定方法的出现，还可以发现它不是均一的。绝对的标准只有是把制备的全部结构弄清楚并经过人工全合成证明具有相同的生理活性，才能肯定所分离的物质是绝对纯净的。但通过这样严格的核对，小分子物质还是容易办到的，大分子物质如蛋白质、酶、核酸或某些多糖则是一件十分困难的事了。就目前水平来说，除了极少数成功的例子外，生物大分子的结构全面分析及人工全合成工作还处于早期发展的阶段。

现以蛋白质为例，说明均一性试验常用的一些物理—化学方法。蛋白质均一性的经典试验上要基于它的溶解度、电泳和沉降行为。近年来增加了末端氨基酸残基测定方法，即一个纯的蛋白质含有一定量末端氨基酸残基，而且这些残基成整数比例地存在于蛋白质分子中，如有其他末端氨基酸残基和不成整数比例存在于蛋白质分子中则表示该蛋白质不纯。另还有生物特殊功能测定法，具有某些特殊功能的蛋白质，如酶、激素蛋白、载体、抗体等，都可以通过其特有的催化效率、生理活性和免疫反应等加以测定，这种测定方法常可以检出非常低的杂质含量，在某种意义上比物理和化学鉴定更为优越。现就蛋

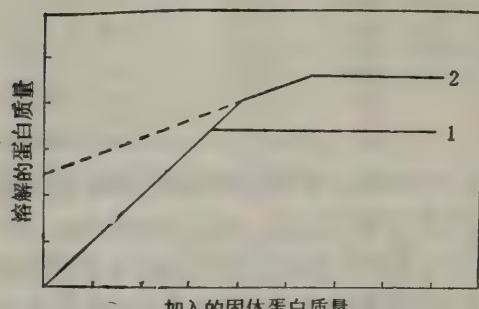


图 1-4 蛋白质的溶解度曲线

蛋白质均一性常用的几种鉴定方法介绍如下：

1. 溶解度法 这主要根据 Gibb 相律理论而建立的一种经典测出物质纯度的方法。它不仅用于蛋白质，也可用于其他物质的纯度测定。Gibb 相律理论认为，一个单一成份的物质在一定条件下其溶解度是一定的，因此，当某一物质在溶剂中的溶解度达到饱和时，其溶解曲线有着非常明显的转折点。溶解度测定法操作简单，方法也很灵敏。例如用此法测定酶的纯度时，将一系列不同量的酶制剂分别加入等容积的溶剂中（水或盐溶液）。搅拌溶解后，过滤除去固体部分。然后分别测定各管滤液中蛋白质含量或酶的活力，当固体酶蛋白溶解后未达到饱和度时，加入的酶量和滤液中的蛋白质量或酶活力是按比例上升的。加入酶量至一定程度即达到饱和度时，固体酶蛋白则不能溶解，滤液中的蛋白质含量或酶活力也不再提高。于是，在溶解度曲线上在饱和度时出现一个转折。如固体酶制剂中含有少量不纯物质时，就不会出现一个明显的饱和度转折点。如图 1-4 所示^[14]。

在图 1-4 中，曲线 1 只出现一个明显转折点，表示只有一种蛋白质组份。曲线 2 含有两种组份的混合蛋白质，故出现二个转折点。一般来说，混合蛋白质中有多少组份便出现多少个转折点，但实际上组份太多时，溶解度曲折点便不明显了。曲线 1 在转折点以前直线的斜率应为 1，转折点以后直线与横座标平行，斜率为零。曲线 2 在二个转折点之间直线的斜率（图中虚线部分）表示不纯成份在混合蛋白质中所占比例。

溶解度法测定物质均一性的试验，在实际应用时常选择几个不同 pH 和离子强度的条件进行，使所得结果更加准确。溶解度法的测试工作因需要大量的样品，现在已很少应用。

2. 电泳均一性的测定法 近二十年来电泳法有了很大发展。早期在自由溶液中，建立在不同 pH 及离子强度条件下测定带电物质电泳迁移率，以表示电泳的均一性，在理论上是很理想的，但在实际操作中常存在许多影响因素，难以达到理想程度。前沿电泳法则主要由于分辨率较低及使用的仪器和操作都比较复杂，所以使用的人不多。此外，以上两种方法样品用量也比较多，故已渐渐被凝胶电泳所代替。凝胶电泳不仅具有电泳作用，同时还具有分子筛作用。因此有极高的分辨能力。如聚丙烯酰胺凝胶电泳可以检测出 10^{-9} 至 10^{-12} 克样品的含量，含量 10—15 微克分子的蛋白质或 5—10 微克左右的核酸在一定的 pH 下能做出很漂亮的均一性试验的结果。凝胶电泳在测定样品均一性的同时，还可以分析鉴定样品分子大小和形状。是目前许多生物大分子普遍采用的均一性鉴定的方法。凝胶电泳也适用于小分子电解质的纯度测定。

用凝胶电泳（包括聚丙烯酰胺凝胶电泳）进行蛋白质均一性测定时，一般都要变换二至三种 pH 值进行实验，才能对所得结果是否均一加以评定。蛋白质可以作为阴离子或阳离子进行电泳试验，核酸只能作为阴离子进行试验。近年来，还发展了各种免疫电泳和最近流行专门检验糖蛋白使用的亲和电泳。它们都是由凝胶电泳衍生出来的，具有更专一，操作更简便的优点。

3. 高速离心沉降法 对于蛋白质及其他生物大分子均一性的测定也是一个经典方法，在理论上这一方法是完善的。主要问题是离心设备本身的缺陷，以至每个组份在离心管中所能移动的距离很短。如果每个组份的分子大小、形状、带电性质差别不大时，由于影响分子移动的各种因素综合平衡的结果，往往使各组份所受的力场作用相等，于是就很难区分。所以使用高速离心沉降方法测定物质的均一性，其精确度的提高受到一定限制。

但由于其具有测定时间短，样品用量少等优点，现仍是经常使用的方法之一。

以上仅就蛋白质均一性测定作一简略讨论，对于其他小分子物质纯度的测定，供使用分析方法更多，如制备物获得一定量的结晶后，可进行核磁共振波谱、质谱，紫外光谱，红外光谱测定，或作高效液相色谱、气相色谱、旋光和熔点等试验，经过综合分析后，便可以对被鉴定物作出纯度的结论。

有关各类生化物质的分析鉴定方法，本丛书各分册均已详细介绍。这里不再赘述。

参 考 文 献

- [1] 沈同、王镜岩、赵邦娣主编：生物化学，人民教育出版社（1980）
- [2] Lehninger, Albert L. Biochemistry—The molecular basis of cell structure and function, Worth Publishers Inc., 2nd ed. (1975) [中译版,上册,科学出版社(1981)]
- [3] 中山大学生化微生物教研室编：生化技术导论，人民教育出版社（1979）
- [4] 阿南功一等著：基础生化实验法[2]，日本丸善株式会社（1974）
- [5] W. 费迪南德著：酶分子(中译本)，科学出版社（1980）
- [6] Morris, C. J. O. R. and Morris, P. Separation Methods in Biochemistry, 2nd Ed., p. 5—8, Pitman publishing, Canada (1976)
- [7] Strain, H. H., Sato, T. R., and Engelke, J. *Analyt. Chem.*, 26, 90(1954)
- [8] Finney, D. J., Statistical Methods in Biological Assay, Griffin, London (1952)
- [9] T. G. 库珀著：生物化学工具(中译本)，人民卫生出版社（1980）
- [10] B. L. 威廉斯, K. 威尔逊编：实用生化化学原理和技术(中译本)，科学出版社（1979）
- [11] Atkison, A., *Process Biochem.*, 8(8): 9(1973)
- [12] Steers, E., Cuatrecasas, P. and Pollard, H. B., *J. Biol. Chem.*, 246: 196 (1971)
- [13] Mizukami, H., Nordlöv, H., Lee, S. L. and Scott, A. J., *Biochemistry*, 18: 3760 (1979)
- [14] Neilands, J. B. and Stumpf, P. K., Outlines of Enzyme Chemistry, 2nd Ed., John Wiley and Sons, Inc., N. Y. (1958)

第二章 提取及溶剂分离法

苏 拔 贤

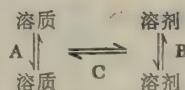
第一节 引 言

提取常指制备物与细胞固体成份或其他结合成份的分离，由固相转入液相或从细胞内生理状态转入外界特定溶液环境的过程。如果被提取物质在细胞内呈固相或与固体结合存在，提取时由固相转入液相，常称为固一液萃取。如被提取物质原来已呈液相存在，提取时由一液相转入另一互不相溶的液相，这种提取方法称液一液萃取，或称抽提。提取、萃取和抽提英文都是 Extraction，其含义基本上相同。习惯上，提取多指分离纯化前期，被提取物质从破碎的细胞中释放出来的过程，而抽提则贯穿在分离纯化整个过程中。如核酸制备中用氯仿或苯酚反复振荡抽提除去蛋白质，分离 DNA 和 RNA，或用乙酸乙酯从醇提取液抽提一些脂溶性类脂质等。所以提取应是分离纯化工作的开始，提取的效果，主要取决于被提取物在溶剂中溶解度的大小，由固相扩散到液相的难易，同时，选择提取的条件对制备物稳定性的影响，是否有利于以后的提纯步骤等因素均应顾及。

第二节 选用的溶剂与物质溶解度的一般规律

溶解度因素用于分离提纯有两个主要的目的，一是选择一个对制备物溶解度大而对杂质溶解度小的溶剂，使制备物从混合组份中有选择地被孤离出来；另一是选择一个对制备物溶解度小而对杂质溶解度大的溶剂，使制备物沉淀或结晶析出。但不论是使溶质有选择地溶解或有选择地沉淀都是为了达到与杂质分离的目的。

一个物质溶解度的大小与溶质和溶剂性质都有关。即溶质—溶质，溶质—溶剂，溶剂—溶剂三个相互作用力综合平衡的结果，这种相互作用可用下图表示：



过程 A 是溶质分子相互作用，过程 B 是溶剂分子相互作用，过程 C 是溶质与溶剂相互作用。这三种相互作用过程中，如果溶质—溶剂相互作用占优势，则溶质的溶解度大。反之如溶质—溶质或溶剂—溶剂其中一个系统相互作用很强，或者两个系统两个系统相互作用都很强，则溶质在该溶剂中的溶解度小。

溶质—溶质，溶剂—溶剂，溶质—溶剂之间相互作用力主要有：

- 〈1〉偶极—偶极相互作用；
- 〈2〉偶极—诱导偶极作用；
- 〈3〉弥散力；

〈4〉 氢键；

〈5〉 离子基团的静电作用等。

当然，要定量测定每一种作用力是十分困难的，影响因素也很复杂。所以对于一个有机分子或生物分子来说，其在某一溶剂中的溶解度，往往只能根据实际表现而加以描述。如属已知物质，可查阅有关资料或手册。对于一个未知物质，只能根据物质溶解的一般规律进行预试验，最后确定其溶解度性质。物质溶解性质的一般规律可归纳如下几点：

1. 极性物质易溶于极性溶剂中，非极性物质易溶于非极性溶剂中。能溶于水的物质一般都是极性分子或离子化合物，有些化合物虽然是非极性物质，但分子内有较多极性基团，也易溶于水，如糖类。
2. 碱性物质易溶于酸性溶剂中，酸性物质易溶于碱性溶剂中。
3. 在极性溶液中，溶剂的介电常数的减少，溶质的溶解度也随之减少。

上述规律也可以用所谓相似物溶解于相似物的原则进行解释^[1]。所谓相似，一方面表示溶质、溶剂分子结构上的相似，另一方面是指溶剂与溶质二者分子间作用力大小相似。前者如石油等烃类溶剂是烃类化合物的优良溶剂。后者例子如具有-OH、COOH、NH₂、SO₄²⁻……等基团之物质都易溶于水，因这些基团周围有与水分子周围同样大小的引力场，含有这些基团的分子能均匀地分布于水分子之间，并通过一定的配价键而相互结合。己烷不溶于水而溶于苯，由于己烷与苯分子间吸引力大致相同，而已烷与水分子间吸引力很小，水分子自身吸引力较大之故。相似物溶于相似物的结论一般地符合实际情况。

一些常用溶剂按其极性的大小，可依顺序大致排列如下：饱和烃类<全卤代烃类<

表 2-1 Hecker 的溶剂分类法

类别	a	b	c	d	e
形成氢键的能力 (个数)	3个或更多	2个	1	1	0
	A和D	A和D	A	D	
溶剂功能团	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{O}-\text{H} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{C}- \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \\ \\ -\text{C}-\text{C}- \\ \quad \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{OH} \\ \\ \text{OH} \\ \\ -\text{C}-\text{C}- \\ \quad \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \\ \\ -\text{C}-\text{C}- \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{AlK}-\text{OH} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{OH} \quad \text{O} \\ \\ \text{R}=\text{NOH} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{CN} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{NO}_2 \\ \\ \text{Ar}-\text{OH} \\ \\ \text{R}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{R}_2=\text{NH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CHO} \\ \\ \text{R}_2=\text{CO} \\ \\ \text{R}_2=\text{O} \\ \\ \text{R}_3\equiv\text{N} \\ \\ \text{R}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CHCl}_3 \\ \\ \text{CHCl}_2- \\ \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CCl}_4 \\ \\ \text{烃类} \end{array}$

D=质子供体 A=质子受体

不饱和烃类<醚类<未全卤代烃类~脂类<芳胺类<酚类<酮类<醇类。

希克卡(Hecker)认为溶剂按极性进行分类带有较多经验成份,而按形成氢键能力分类科学性更强些。他提出非电解质溶于极性或非极性溶剂时,根据形成氢键能力的大小,可把溶剂分为五类^[2]:

(1) 能形成二个以上氢键的溶剂分子,在溶液中这些分子有三维空间网状结构。水就是这类溶剂的典型例子,水的二个氢原子和一个氧原子都可以形成氢键。(2) 能形成

表 2-2 一些常用溶剂的性质

溶剂名称	沸 点	介电常数	溶解度 (20—25°C)	
			溶剂在水中(%)	水在溶剂中(%)
石 油 醚	36—65°C	1.80	几乎不溶	几乎不溶
己 烷	96°C	1.88	0.00095%	0.0111%
环 己 烷	81°C	2.02	0.010%	0.0055%
二 氧 陆 环	101°C	2.21	任意混溶	任意混溶
四 氯 化 碳	77°C	2.24	0.077%	0.010%
苯	80°C	2.29	0.1780%	0.063%
甲 苯	110°C	2.37	0.1515%	0.0334%
间二甲苯	139°C	2.38	0.0196%	0.0402%
二 硫 化 碳	46°C	2.46	0.294%	<0.005%
乙 醚	35°C	4.34	6.04%	1.468%
醋 酸 戊 酮	149°C	4.75	0.17%	1.15%
氯 仿	61°C	4.80	0.815%	0.072%
醋 酸 乙 酮	77°C	6.02	8.08%	2.94%
醋 酸	118°C	6.15	任意混溶	任意混溶
苯 胺	184°C	6.89	3.38%	4.76%
四 氢 吡 嘌	66°C	7.58	任意混溶	任意混溶
苯 酚	182°C	9.78(60°C)	8.66%	28.72%
毗 喹	115°C	12.4	任意混溶	任意混溶
叔 丁 醇	82°C	12.47	任意混溶	任意混溶
正 戊 醇	138°C	13.9	2.19%	7.41%
异 戊 醇	131°C	14.7	2.67%	9.61%
仲 丁 醇	100°C	16.56	12.5%	44.1%
正 丁 醇	118°C	17.5	7.45%	20.5%
甲 乙 酮	80°C	18.5	24.0%	10.0%
异 丙 醇	82°C	19.92	任意混溶	任意混溶
正 丙 醇	97°C	20.3	任意混溶	任意混溶
醋 酸 苄	140°C	20.7	微 溶	微 溶
丙 酮	56°C	20.7	任意混溶	任意混溶
乙 醇	78°C	24.6	任意混溶	任意混溶
甲 醇	65°C	32.7	任意混溶	任意混溶
二 甲 基 甲 酰 胺	153°C	36.7	任意混溶	任意混溶
乙 胨	82°C	37.5	任意混溶	任意混溶
乙 二 醇	197°C	37.7	任意混溶	任意混溶
二 甲 亚 硼	189°C	46.68	25.3%	25.3%
甲 酸	101°C	58.5	任意混溶	任意混溶
水	100°C	81		
甲 酰 胺	211°C	111	任意混溶	任意混溶

二个氢键的溶剂分子，即既是氢供体又是氢的受体，例如脂肪族的醇类。(3) 只作质子受体的溶剂分子，如脂肪族的醚类。(4) 只作质子供体的溶剂分子，如氯仿。(5) 不能形成氢键的烃类，如四氯化碳。

以上分类法见表 2-1 所示。

按照表 2-1 的溶剂分类，a、b 二类溶剂宜用于极性化合物的提取，c、d 二类溶剂宜于对溶液中弱极性或非极性化合物进行抽提。在抽提中如加入质子供体溶剂酚或质子受体溶剂胺，均可增加质子受体溶质或质子供体溶质的溶解度。

以上仅对物质溶解一般规律在理论上简单介绍，实际应用时，各类物质的溶解有关数据均可在手册或文献中查到。现将一些常用溶剂的沸点、介电常数及溶解度列于表 2-2。

第三节 影响物质溶解度的几个主要因素

一、离子强度

离子强度是影响物质溶解度主要因素之一。有些物质在高离子强度下溶解度增加（如 DNA-蛋白），另一些物质（如 RNA-蛋白）在低离子强度下溶解度增加，而在高离子强度下溶解度反而减少。绝大多数球蛋白和酶，在低离子强度的溶液中都有较大的溶解度，如在纯水中加入少量中性盐，蛋白质溶解度比在纯水时大大增加。称为“盐溶”现象。

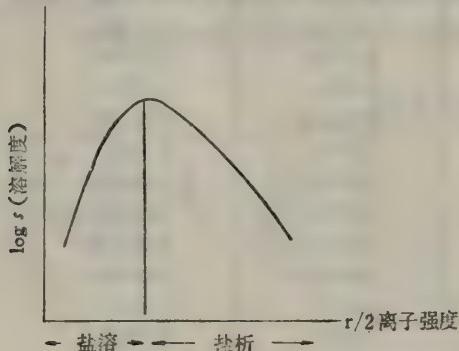


图 2-1 溶液离子强度与蛋白质溶解度的关系
用于大多数生化物质的提取。

但中性盐的浓度增加至一定时，蛋白质的溶解度又逐渐下降，直至沉淀析出。则称为“盐析”现象。溶液离子强度与蛋白质溶解度的关系见图 2-1。盐溶现象的产生主要是少量离子的活动，减少了偶极溶质分子之间极性基团静电吸引力，增加了溶质和溶剂相互作用力的结果。盐溶现象不仅在水溶液中，而且在低介电常数溶剂如乙醇中也同样发生，低离子强度溶液除了增加许多生化物质的溶解度外，还对一些物质生理活性有稳定作用，所以稀盐溶液常

二、pH 值

许多有机分子或生物分子都同时具有酸性或碱性基团，这些基团在不同 pH 下有着不同的解离状态，在水中或有机溶剂中便有不同溶解度。当两性物质分子上酸、碱性基团解离情况相等时，整个分子所带电荷总和为零，此时溶液的 pH 值称为该分子的等电点。在等电点时，两性溶质分子易相互聚集，溶解度最低，而远离等电点两侧的 pH 值时溶解度增大。对于一些酸性或碱性小分子物质，当 pH 很低时，酸性物质大部分呈非解离分子状态，而碱性物质大部分呈阳离子状态。如 pH 很高时，酸性物质大部分呈阴离子状态存在，而碱性物质则呈非解离分子状态。离子状态的物质，不论是阳离子或阴离子都易溶于

水，非离解的分子状态则易溶于有机溶剂。所以当酸性物质处于低 pH 值，碱性物质处于高 pH 值时，都可以转溶于有机溶剂。但有些两性物质如氨基酸，在等电点以外任何 pH 值时，均呈离子状态存在，所以氨基酸一般不用有机溶剂提取（稀的乙醇例外）。

酸性或碱性物质在不同 pH 下的溶解性质的差异，和它们的酸性与碱性的强弱程度有关。如非常弱的酸，则需要高 pH 值的溶剂内，才能使这种酸解离。

以上从 pH 值与物质溶解度之间的关系作一简单的讨论。对蛋白质、酶、核酸等生物大分子来说，提取溶液选择 pH 值首先要保证这些生物大分子活性不受破坏为前提，过酸、过碱均尽量避免，一般控制在 pH 6—8 范围，常选接近中性的 pH 比较稳定。如单纯从溶解度方面考虑，等电点在酸性范围的蛋白质或酶，可选用偏碱性溶液提取，等电点在碱性范围时，则选用偏酸性溶液提取，酸性条件还可以解离一些蛋白质与其他组分的离子键结合。并有利于细胞壁的溶解。

三、温 度

温度的升高可增加物质的溶解度，减少溶液的粘度，这是大家熟知的。所以，略为提高温度对提取是有利的，这叫热提取法。热提取法多用于一些植物成份和某些小分子生化物质，提取温度常控制在 50~70℃ 左右。热提取法虽然提取效率高，但所得提取液含杂质较多，不如冷提法含杂质少，这是热提法的缺点，对于绝大多数生物大分子，除了某些特殊例子外，一般提取温度选择 0~10℃ 范围，选择温度范围不但使溶质有较好溶解度，更主要是防止生物大分子的变性。

四、去 垢 剂

去垢剂是一类既具有亲水基又具有疏水基的物质。可分阴离子、阳离子和中性去垢剂等多种类型，去垢剂一般具有乳化、分散和增溶作用，其中中性去垢剂对蛋白质的变性作用影响较少，宜于蛋白质或酶提取之用。一般市售中性去垢剂有 Tween 20、40、60、85、Triton X-100 420；Lubrol W 等多种规格。中性去垢剂使用后可通过 Sephadex LH-50 柱除去^[3]，欲直接用 DEAE-Sephadex 柱层析，不必先分离除去去垢剂^[4]，洗脱所得蛋白质溶液，接着可用盐或有机溶剂分部沉淀。

某些阴离子去垢剂如十二烷基硫酸钠，它可以促进核蛋白的解体，将核酸释放出来，并对核酸酶有一定抑制作用，常用于核酸的提取。

第四节 固—液萃取中扩散作用的应用

当提取物是由固相转为液相，或由细胞内转到细胞外时，提取的效率与物质的扩散作用有关。扩散作用中各项因素关系可用下式表示：

$$G = DF \frac{\Delta C}{\Delta x} t$$

式中：G 为已扩散的物质量。

D 为扩散系数。物质分子量越大，扩散系数越小，温度升高，扩散系数增大，溶液粘度增加，扩散系数减少。

F 为扩散面积。

ΔC 为两相界面溶质的浓度差， ΔC 越大，扩散越快。

Δx 为溶质扩散的距离， Δx 越大，物质扩散到溶剂中的速度越慢。

t 为扩散时间，时间越长，扩散的量越多。

从上式各因素的关系可知，为了增加扩散物质的量，也就是提高提取速度，常采取如下措施：

〈1〉提高材料的破碎程度，以增加扩散面积，减少扩散距离。

〈2〉进行搅拌，使已扩散的溶质迅速与溶剂混匀，以保持两相界面最大浓度差，或分次提取，不断更换新鲜溶剂，以提高扩散速度。

〈3〉延长提取时间，提高提取温度（但对一些不耐热的物质，温度不宜过高），以及减少溶液粘度（如属大分子核酸干扰，加入少量鱼精蛋白或硫酸链霉素沉淀去除）等。

固一液提取常见于动物骨骼、肌肉组织及中草药等材料，往往由于这些材料的组织细胞破碎比较困难，提取效果受扩散作用的影响较大。

实际上从破碎后的固体细胞提取所需组分，当细胞破碎程度及提取温度受到限制时，采用少量多次提取方法较为有利^[9]。

设 K 为所制备的溶质（A）在固相和液相中分配系数， x_0 为固相中原有的（A）的重量， x_n 为提取 n 次后固相中所剩（A）的重量。W 为被抽提固体材料体积，L 为每次抽提剂所用溶剂的体积。可得如下公式：

$$x_n = \left[\frac{KW}{KW + L} \right]^n$$

从上式可看出用同样体积的溶剂抽提，分二次抽提比一次抽提收率高得多，抽提次数与 $\frac{x_n}{x_0}$ 比可用图 2-2 表示：

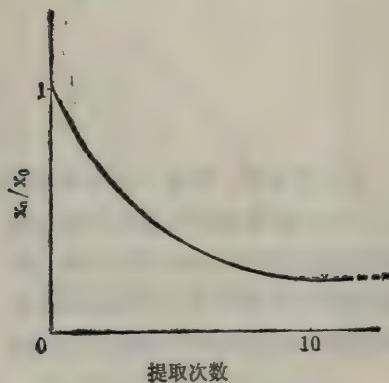


图 2-2 提取次数与提取率的关系

第五节 液一液萃取时分配定律的应用

液一液萃取选用的溶剂必须与被抽提的溶液互不混和，且对被抽提的溶质有选择性的溶解能力。萃取的过程是溶质在两相中经充分振荡平衡后按一定比例分配的过程。溶质在两相中达到平衡后分配比例受分配定律的支配，分配定律可表示为在恒温、恒压及比较稀的浓度下，溶液在两相中的浓度分配比是一个常数，即：

$$K = \left(\frac{C_1}{C_2} \right)_{\text{恒温, 恒压下}}$$

式中 C_1 ——表示分配达到平衡后，在上层液相中溶质的浓度。

C_2 ——表示分配达到平衡后，在下层液相中溶质的浓度。

K——为分配常数。

不同溶质在不同溶剂中有不同的K值。K值愈大，表示该溶质在上层液相中溶解度愈大，K值愈小，表示该溶质在下层液相中溶解度愈大。当混合各组分的K值很接近时，须通过不断更新溶剂进行多次抽提才能彼此分开。分配系数与物质在二相系统中的溶解度有关，但分配系数不等于溶质在二个相溶剂中溶解度的比例，因溶解度是指饱和状态而言，而一般萃取常限于稀的溶液。

如溶质分子在抽提的溶剂有缔合现象，则分配定律公式改写为：

$$K = \frac{C_1}{C_2^n}$$

$$n = \frac{M_1}{M_2}$$

n为溶质缔合后分子量变化的数目。其数值等于在上层相中的分子量(M_1)和下层液相中分子量(M_2)之比。例如，醋酸分子量为60，在水和乙醚之间分配，因没有缔合现象发生，故， $M_1 = 60, M_2 = 60$

$$n = \frac{60}{60} = 1$$

如醋酸在水和苯之间分配，固醋酸在苯中形成 $(CH_3COOH)_2$ 缔合分子，故 $M_2 = 120$ ，此时

$$n = \frac{M_1}{M_2} = \frac{60}{120} = \frac{1}{2}$$

所以醋酸在水—苯体系中，分配系数K应为：

$$K = \frac{C_1}{C_2^{\frac{1}{2}}}$$

液—液萃取在生化制备中应用十分普遍，最常用的二相溶剂：水，水—醇为一相，另一相为与水不相混和的各种碳氢化合物，如低级醚，酯、苯酚等。液—液萃取有简单一次抽提和多次抽提，抽提时可用普通分液漏斗人工操作，也可以用自动转液的逆流分配仪。逆流分配仪是一种多次液—液萃取的装置，可以自动进行数十次甚至数百次连续的转液抽提，最后将一系列K值十分相似的组份，经过多次二相系统不断抽提和重新分配后，达到彼此分离的目的。逆流分配仪已广泛用于多肽如垂体激素、加压素、催产素、短杆菌肽和tRNA的分离。

第六节 提取时对具有生理活性物质的保护措施

对于一些具有生理活性的物质的提取，除了考虑所选用的溶剂对被提取物有较大的溶解度，对杂质有较少的溶解度外，还应综合考虑提取所用的溶剂中各种成份的组合及其他因素，使这些活性物质在提取时处于稳定状态，对于一些生物大分子如蛋白质、酶和核酸来说，主要措施常有如下几点：

1. 采用缓冲系统。防止提取过程中某些酸碱基团的解离，造成溶液中pH值变化幅度过大，导致某些活性物质的变性，或由于pH影响提取的效果。在生化制备中，提取用的缓冲系统常有磷酸盐缓冲液，柠檬酸盐缓冲液，Tris缓冲液，醋酸盐缓冲液，碳酸盐缓

冲液和巴比妥缓冲液等。缓冲液所使用的浓度均比较低，以利于增加溶质的溶解性能。

2. 加入保护剂。防止某些生理活性物质的活性基团及酶的活性中心受到破坏。如最常见的巯基，是许多活性物质和酶催化的活性基团，它极易被氧化，故提取时常加入一些还原剂如半胱氨酸， α -巯基乙醇，二巯基赤藓糖醇，还原型谷胱甘肽等以防止它的氧化。其他的措施如提取某些酶常加入一些底物。一些易受重金属离子抑制生理活性的物质，加入某些金属螯合剂，把有害金属离子螯合掉，而保持被提取的活性物质的稳定性。

3. 抑制水解酶的破坏。是提取生化物质中最重要保护性措施之一。可根据不同水解酶的性质采用不同方法，如需要金属离子激活的水解酶（如 DNase），常加入 EDTA 或用柠檬酸缓冲液除去溶液中的某些金属离子，使酶的活动受到抑制。对热不稳定的水解酶，可用热提取法使之失去作用，或根据水解酶的溶解性质的不同，采用不同 pH 值提取以减少水解酶释放到提取液中的机会；或选用 pH 范围使酶活力最低。但最有效方法还是针对性地加入某些抑制剂，以抑制水解酶的活性。核糖核酸酶是制备完整 RNA 分子的最大障碍，在长期研究中已发展了许多特殊抑制剂对付此酶。例如阴离子去垢剂十二烷基硫酸钠，脱氧胆酸钠，萘-1,5-二磺酸钠，三异丙基萘磺酸钠，4-氨基水杨酸钠等，均已被广泛应用于核酸的提取。另最近还使用了皂土（Bentonite, $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ），肝素（Heparin），DEP（Diethyl-pyrocarbesate，二乙基焦碳酸盐），蛋白酶 K（该酶最适 pH 7.5 ~ 12，对热稳定，在很高浓度的 SDS 和尿素溶液中仍有很高活性）等多种核酸酶的抑制剂，使具有活性的核酸提取纯化工作获得了很大进步。

此外提取各种具有活性的蛋白质或酶分子时，常加入某些蛋白酶抑制剂如苯甲基磺酰氟化物（PMSF），二异丙基氟磷酸（DIFP 或 DFP），碘乙酸等。但这些抑制剂在抑制蛋白水解酶的同时，也常抑制其他蛋白质和酶的活性，使用时必须小心选择。一般说，提取蛋白质时，加入蛋白水解酶的抑制剂没有象使用核酸酶抑制剂在核酸提取时那样普遍和迫切。

4. 其他一些特殊要求的保护措施，除前面已提及过种种引起生物大分子变性因素，如紫外光、强烈搅拌、过酸过碱、高温、冻结等均避免外。某些生物大分子提取时的特殊要求，如固氮酶钼—铁蛋白，提取分离时严格要求无氧条件下进行，以及某些对冷或热敏感的蛋白要求一定的温度下操作等均应根据不同具体对象予以不同处理。

第七节 各类物质的提取分离

一、蛋白质和酶的提取分离

（一）不同结构的蛋白质及其溶解性质

蛋白质按其功能可分为活性蛋白和非活性蛋白二类，按结构又可分为简单蛋白和结合蛋白二类；再一种分类法是根据蛋白质的溶解度差别而分为水溶性蛋白，醇溶性蛋白等，还有一类硬蛋白不溶于水，稀酸，稀碱和有机溶剂，遇强酸、强碱水解。各类蛋白质的溶解性质见表 2-3。

根据表 2-3 所列各类蛋白质的溶解性质，可以看出大部份蛋白质可溶于水、稀盐、稀碱或稀酸溶液，少数与脂类结合的蛋白质则溶于乙醇、丙酮、丁醇等有机溶剂。蛋白质在

表 2-3 不同结构的蛋白质及其溶解性质

蛋白类别	溶解性质
简单蛋白质	
1. 白蛋白	溶于水及稀盐、稀酸、稀碱溶液，可被 50% 饱和度硫酸铵析出。
2. 球蛋白	一般在等电点不溶于水，但加入少量的盐、酸、碱则可溶解。
真球蛋白	溶于水，可为 50% 饱和度硫酸铵析出。
拟球蛋白	溶于 70—80% 乙醇中，但不溶于水及无水乙醇。
3. 酵溶蛋白	在等电点不溶于水，也不溶于稀盐液，易溶于稀酸、稀碱溶液。
4. 谷蛋白	溶于水和稀酸，易在稀氨水中沉淀。
5. 精蛋白	溶于水和稀酸，易在稀氨水中沉淀。
6. 组蛋白	
硬蛋白质	不溶于水，盐、稀酸、稀碱
结合蛋白质	此类蛋白质溶解度性质随蛋白质与非蛋白结合部份的不同而异，除脂蛋白外，一般可溶于稀酸、稀碱及盐溶液中，脂蛋白如脂质部分露于外，则脂溶性占优势，如脂质部份被包围于分子之中，则水溶性占优势。
(包括磷蛋白，粘蛋白，糖蛋白，核蛋白，脂蛋白，血红蛋白，金属蛋白，黄素蛋白等)	

不同溶剂中的溶解度差别，主要取决于蛋白质分子中极性基团与非极性基团的比例和这些基团的排列位置及偶极距，因此采用不同溶剂和调整影响蛋白质溶解度的外界因素如温度、pH、离子强度等，即可把所需的蛋白质和酶从细胞内复杂的组份中提取分离出来。

(二) 蛋白质及酶的一般提取方法

1. 水溶液提取 凡能溶于水、稀盐、稀酸或稀碱的蛋白质或酶，一般都可用稀盐溶液或缓冲溶液进行提取。稀盐溶液和缓冲溶液有利于稳定蛋白质结构和增加蛋白质溶解度。加入的提取液的量要适当，加入量太少提取不完全，加的量太多，则不利于浓缩，一般用量为原材料 3—6 倍体积左右，可一次提取或分次提取。提取时常缓慢搅拌，以提高提取效率。以盐溶液或缓冲液提取蛋白质和酶时，常综合考虑下列因素：

(1) 盐浓度：提取蛋白质的盐浓度，一般在 0.02—0.2M* 的范围内。常用稀盐溶液和缓冲液有 0.02—0.05M 磷酸缓冲液，碳酸缓冲液，0.09~0.15M 氯化钠溶液。在某些情况下，也用到较高的盐浓度，如提取脱氧核糖核蛋白及膜蛋白。有时为了螯合某些金属离子和解离酶分子与其他分子的静电结合，选用柠檬酸缓冲液和焦磷酸钠缓冲液可获得较好效果。故稀盐溶液和缓冲溶液的浓度及缓冲液的组份的选择，应根据不同对象及具体情况而定。有时为了破坏蛋白质与其他物质的离子键或氢键的结合，加入少量多价阴离子也有助于对这些蛋白质提取分离。总的来说，能溶于水溶液而与细胞颗粒结合较松的蛋白质或酶，在细胞破碎以后，只要选择适当的盐浓度和 pH 值，一般是不难提取的。

(2) pH：蛋白质和酶所用的提取液 pH 值一般选择在被提取的蛋白质等电点两侧的稳定区内。如细胞色素丙是一碱性蛋白质，常用稀酸提取。肌肉甘油醛-3-磷酸脱氢酶是一酸性蛋白质，则用稀碱提取。植物组织中的一些酸性或碱性蛋白质常分别用 0.1%—0.2% 的氢氧化钾水溶液或 1% 碳酸钠溶液提取。在某些情况下，为了破坏所分离的蛋白质与其他杂质的静电结合，选择偏酸 (pH 3—6) 或偏碱 (pH 10—11) 提取，可以使离子

* 1M=1mol/L，下同。

键破坏而获得单一的蛋白成份。

(3) 温度：蛋白质和酶一般都不耐热，所以提取时通常要求低温操作。只有对某些耐高温的蛋白质或酶（如胃蛋白酶、酵母醇脱氢酶及某些多肽激素）才在比较高的温度下提取，使更有利于和其他不耐热蛋白质的分离。

2. 有机溶剂提取 一些和脂质结合比较牢固或分子中非极性侧链较多的蛋白质和酶，难溶于水，稀盐，稀酸和稀碱，常用有机溶剂提取。如丙酮、异丙醇、乙醇、正丁醇等，均可溶于水或部份溶于水，这些溶剂都同时有亲脂性和亲水性。其中正丁醇有较强的亲脂性，也有一定亲水性，在0℃时于水中有10.5%的溶解度。它在水和脂分子间起着类似去污剂的桥梁作用，在取代蛋白质与脂质的结合位置后，由于丁醇与蛋白质极性基团结合的竞争力比脂质大，能阻止脱落了的脂质重新与蛋白质结合。使原来蛋白质在水中溶解度大大增加。丁醇在水溶液及各种生物材料中解离脂蛋白的能力极强，是其他有机溶剂所不及的。我国生化工作者曾用此法成功地提取了琥珀酸脱氢酶^[6]，对于碱性磷酸酯酶的提取效果也十分显著^[7]。

有些蛋白质和酶既溶于稀酸、稀碱，又能溶于一定比例的有机溶剂。在这样的情况下，采用稀的有机溶剂提取常常是为防止水解酶的破坏，并兼有除杂和提高纯化效果的作用。现举例说明如下：

如胰岛素可溶于稀酸、稀碱和稀醇溶液，但针对组织中共存的糜蛋白酶对胰岛素有极高的水解活性，采用68%酒精溶液并用草酸调至pH 2.5~3.0，这样便能在三方面抑制了糜蛋白酶的活性：(1) 68% 酒精可以使糜蛋白酶暂时失活；(2) 草酸可以除去激活糜蛋白酶的金属离子 Ca^{++} ；(3) 选用 pH 2.5~3.0 是糜蛋白酶不适宜作用的 pH 值。而以上条件对胰岛素的溶解度和稳定性并没有影响，并可以除去一部份在稀醇及酸性溶液中不溶解的杂蛋白。当然胰岛素的提取现已有了新的进展，但上面的设计仍是十分合理的。

又如提取垂体前叶 ACTH 常采用酸性 70% 丙酮，其设计原理是酸性可以促进 ACTH 的溶解，而 70% 浓度丙酮对 ACTH 的溶解度没有影响，却可大幅度地抑制其他杂蛋白的溶出，对提高分离纯化的效果极为显著。

3. 从细胞膜上提取水溶性的蛋白质和酶方法^[8] 膜上的蛋白质或酶一般有二种存在状态，一是在膜表面上，与膜成份联系比较松；第二是膜的内在成份之一，或与膜成份结合较紧。蛋白质与膜成份的结合可通过脂质形成复合物，也可以通过金属离子与膜成份结合，或与膜其他蛋白质形成复合物。与膜成份结合较松的蛋白质或酶，经过充分破碎细胞，在一定 pH 范围用稀盐溶液即可提取分离。如线粒体上的细胞色素 c，是与细胞器结合较松的一个酶，用 pH 4.0 的酸或等渗 KCl 溶液破坏其与膜成份的静电引力，线粒体上的细胞色素 c 即解离转到提取液中。但一些与膜成份结合较牢或属于膜组成的蛋白质，提取则比较困难，须用超声波，去污剂或其他比较强烈的化学处理，才能从膜上分离出来。一般常用方法有如下几种：

(1) 浓盐或尿素等溶液提取：如 NaClO_4 、尿素、胍盐酸盐等溶液均有人应用于提取膜蛋白，当以上溶液浓度达到 2M 时，可抽去 27% 以上的膜蛋白，但使用这样条件易引起蛋白质和酶的变性。

(2) 碱溶液提取：碱性条件也可以解离与膜上成份结合的蛋白质。在 pH 8~11 范围内，某些膜蛋白随着 pH 值的提高而溶解度大大增加，至 pH 11 时，约有 40~50% 的

膜蛋白被抽出，但碱提取法也容易引起蛋白质和酶的失活，应用上不广。

(3) 加入金属螯合剂：蛋白质通过金属离子与膜成份结合时，加入金属螯合剂如 EDTA 可使蛋白质释放出来。用此法曾成功地提取了膜上 ATP 酶的偶联因子 I。EDTA 与超声波联合处理抽提膜上磷酰转移酶，据报导效果更好^[9]。

(4) 有机溶剂抽提^[8, 10]：使用乙醇、吡啶、叔戊醇、正丁醇等溶剂抽提及用冷丙酮做成丙酮粉，是提取膜上与脂质结合的脂蛋白或膜内脂蛋白组份最常用也较有效的方法，其中叔戊醇及正丁醇用于膜内脂蛋白效果尤佳。前已提到正丁醇可在广泛的 pH 值 (pH 3—10) 和温度范围内 (-2—+40°C) 使用。用有机溶剂结合其他方法已成功地提取了多种膜上蛋白质和酶，如 NPDH 脱氢酶，琥珀酸脱氢酶，细胞色素氧化酶，碱性磷酸酯酶，胆碱脂酶等。

(5) 去垢剂处理：去垢剂处理是目前广泛应用于提取膜上水溶性蛋白和脂蛋白的方法，常用的去垢剂有弱离子型去垢剂脱氧胆酸盐，胆酸盐，强离子型去垢剂十二烷基硫酸钠(SDS)，和非离子型去垢剂 Triton X-100 和 Tween、Lubrol 和 Brij 等。去垢剂处理膜蛋白时的浓度通常为 1 % 左右，用此法提取的膜蛋白和酶有细胞色素 b₅、胆碱脂酶、细胞色素氧化酶、DPNH 氧化酶、ADP/ATP 载体蛋白等。Klingenberg 认为用去垢剂分离膜蛋白时，选择去垢剂首先考虑：(1) 去垢剂的溶解能力；(2) 去垢剂的温和性。强离子型去垢剂（如 SDS）一般具有很好溶解能力，但温和情况不理想，容易引起蛋白质变性。弱离子型或非离子型去垢剂对蛋白质变性影响较小，而溶解能力差。去垢剂的溶解能力与溶液的离子强度大小有关。一般来说，离子强度增加，去垢剂的溶解能力也随之增大。所以使用去垢剂溶解膜蛋白时，须考虑各种条件。根据 Klingenberg 等的经验，分离线粒体膜 ADP/ATP 载体蛋白，选用 Triton X100 比用 Lubrol, Brij 和 Aminoxide 等去垢剂效果较好，所得 ADP/ATP 载体蛋白具有较高的天然活性。但主要缺点是 Triton x100 在 280nm 处有强的紫外吸收，干扰用紫外法测定蛋白质的含量^[11]。

脱氧胆酸盐和胆酸盐也常用提取细胞色素系统的酶和线粒体膜上的 ATP 酶^[13]，最近我国尤美莲等比较了 Triton X100-胆酸和脱氧胆酸-胆酸对猪心线粒体内膜 H⁺-ATP 酶复合体的分离效果，结果表明 Triton X100-胆酸盐法，操作简便产率高，重复性好，而脱氧胆酸-胆酸盐法，操作较繁琐，脱氧胆酸对酶活性影响较大^[12]。

另有报导使用去垢剂，再加上温和条件的超声波处理使细胞结构松散开来，可提高膜蛋白的提取率。

(6) 加入酯酶或磷酸酯酶水解蛋白质-脂质复合物，也是一个有用的方法：其中蛇毒中提取的磷酸脂酶 A 主要作用于磷脂，最适 pH 为 6—8。从胰脏中提取的酯酶作用于单、二、三甘油酯，酶作用最适 pH 为 7—8。酯酶和磷酸酯酶均需要 Ca²⁺ 所激活。用酶法处理提取的膜蛋白及酶有细胞色素 c，α-磷酸甘油脱氢酶，TPNH-细胞色素 c 还原酶等。

(三) 蛋白质和酶提取后的进一步纯化

蛋白质和酶从细胞内提取出来后，仍处于十分混杂的体系中，必须进一步纯化。但经过提取除去了大量与制备物理化性质差别较大的杂质，只剩余与制备物理化性质大致相近或类似的物质。因此，经过有选择性的提取这一步骤，对以后纯化工作创造十分有利条件。

表 2-4 若干凝集素分离纯化方法^{[1,2]*}

凝集素名称及来源	分离纯化方法	分子量	亚基数	抑制剂	血型专一性
(<i>Abrus precatorius</i>) 相思豆素	NaCl 溶液抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, Sephadex 亲和层析	有毒 无毒 65,000 120,000	2 4	D-半乳糖	-
(<i>Agaricus bisporus</i>) 蘑菇	NaCl 溶液抽提, DEAE-纤维素, Sephadex G-100, 磷酸纤维素色谱	58,000		D-半乳糖 D-GalNAC	+
(<i>Arachis hypogaea</i>) 花生 PNA	NaCl 溶液抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, Sepharose- ϵ 氨基乙酰- β -半乳糖胺 亲和层析, 半乳糖洗脱	110,000	4	$\text{Gal}\beta(1 \rightarrow 3)\text{-Gal NAC}$ D-半乳糖	T, Tk, Th
(<i>Concanavalia ensiformis</i>) 刀豆 ConA	NaCl 溶液抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, Sephadex G-50 亲和层析, 葡萄糖 或低 pH 缓冲液洗脱	102,000	4	D-葡萄糖 D-甘露糖	
(<i>Crotalaria juncea</i>) 蓖麻原(也称印度麻)	Sephadex 亲和层析, 乳糖洗脱	120,000		D-半乳糖	
(<i>Cucurbita pepo</i>) 西葫芦	含苏糖醇的冰冷的 PBS 抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, Sepharose-甲壳三糖 亲和层析, 0.1M 乙酸洗脱	29,000(凝胶过滤) 20,000(PAGE)	无	甲壳寡糖 \gg GlcNAc	
(<i>Datura stramonium</i>) 曼陀罗	PBS 抽提, 丙酮分级沉淀, Sepharose-胎蛋白亲和层析, Glc NAC 洗脱		2	甲壳寡糖	
(<i>Dolichos biflorus</i>) 双花扁豆 DBL	乙醇沉淀, 或聚亮氨酸-猪 A+H 血型物质亲和层析	111,000	4	D-GalNAC	At, Tn, Cad
(<i>Glycine max</i>) 大豆 SBA	水抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 对乙醇透析, 磷酸钙柱和 DEAE-纤维素柱色 谱或 NaCl 溶液抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, Sepharose-半乳糖亲和层析半 乳糖洗脱	111,000	4	D-GalNAC \gg D-半乳糖	
(<i>Helix pomatia</i>) 蜗牛 HP	NaCl 溶液抽提, 聚亮氨酸-猪 A+H 血型物质亲和层析, GalNAC 洗脱	79,000	6	D-Gal NAC D-Glc NAC	A
(<i>Lathyrus odoratus</i>) 香豌豆	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀, DEAE-纤维素, CM-纤维素柱层析	37,000	可能 2	D-甘露糖 D-葡萄糖	
(<i>Lathyrus sativus</i>) 草香豌豆	Sephadex G-100 亲和层析 DEAE-纤维素层析	43,000		D-甘露糖 D-葡萄糖	
(<i>Lens culinaris</i>) 扁豆 LCA	NaCl 溶液抽提, DEAE-纤维素柱层析, Sephadex 亲和层析, 葡萄糖 洗脱	48,000	2	D-甘露糖 D-葡萄糖	
(<i>Limulus polyphemus</i>) 鲎 LP	超离心、淀粉区带电泳, Sephadex G-200 过滤, Ultragel A-4-牛颌下腺 粘蛋白亲和层析	400,000	18	NeuNAC, NeuNAc, Gal D-葡萄糖醛酸- β -L-艾杜糖 醛(C:1)聚合体	

百脉根 (<i>Lotus tetragonolobus</i>)	PBS 抽提, Sephadex-岩藻亲和层析, 岩藻糖洗脱	A. 120,000 B. 58,000 C. 117,000	4 2 4	L-岩藻糖	H(0)
番 茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	汁 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 脍酶处理的人 B 型血球吸附, GlcNAC 麦糖解离, Sephadex G-200 层析, 或聚亮氨酸-猪 A+H 血型物质亲和层析。	84,000 或 63,000	无	(GlcNAC)	
(<i>Medicago sativa</i> 或 <i>Adenia digitata</i>)	1%BS 抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, Sepharose 4B 亲和层析, 0.2M 半乳糖洗脱	63,000	2	D-半乳糖	
米胚 RGL (<i>Oryza sativa</i>)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, Sepharose 4B-卵粘蛋白层析, CM-纤维素层析	37,000	2	D-GlcNAC	无
利马豆 PLA (<i>Phaseolus limensis</i> 或 <i>P. lunatus</i>)	NaCl 溶液抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 聚亮氨酸-A 血型物质亲和层析、D-GalNAC 洗脱	1) 247,000 2) 124,000		D-GalNAC	A
菜豆 PHA(亦称植物血凝素) (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	SE-Sephadex 层析, Sephadex G-150 凝胶过滤, 磷酸纤维素层析或 Sepharose-甲长脲球蛋白亲和层析, 甘氨酸-HCl 洗脱	128,000	4	D-GalNAC	
豌豆 PSL (<i>Pisum sativum</i>)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, Sephadex G-150 亲和层析, 甘氨酸-HCl 洗脱, 或葡萄糖或甘露糖洗脱	49,000	4	D-甘露糖 D-葡萄糖	
蓖麻 RCA (<i>Ricinus communis</i>)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 脂肪酶亲和层析, 半乳糖或乳糖洗脱, Sephadex G-200 或 G-150 凝胶过滤, 分为 RCA _I 和 RCA _{II}	RCA _I 120,000 RCA _{II} 60,000	4 2	D-半乳糖 D-GalNAC>半乳糖	
刺 槐 (<i>Ribinia pseudoacacia</i> , <i>locustina</i>)	PBS 抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, DEAE-纤维素和 CM-纤维素层析	100,000		具有 D-半乳糖末和甘露糖内核的寡糖	
马 铃 薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	NaAc 缓冲液抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, DEAE-纤维素, CM-纤维素层析, Sephadex G-100 过滤, SP-Sephadex 层析	120,000	4	D-GalNAC D-GlcNAC	
槐 (<i>Sophora japonica</i>)	PBS 抽提,乙醇沉淀,聚亮氨酸-猪胃粘蛋白亲和层析,半乳糖洗脱	138,000	2	D-半乳糖 D-GalNAC	A+B
麦胚 WGA (<i>Triticum vulgaris</i>)	卵粘蛋白亲和层析, 0.1NHCl 洗脱, 或甲壳聚糖亲和层析, 0.02NHCl 洗脱等	34,000	2	D-Glc Nc, NANA	
莉豆 UEA (<i>Ulex europeus</i>)	NaCl 溶液抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, UEA _I , CM-纤维素 Sephadex G-200, Biogel P-200 层析, 脂粉凝胶, 岩藻糖亲和层析, Sephadex G-150, DEAE-纤维素层析、电泳, Biogel P-200 层析淀粉凝胶-甲壳三糖亲和层析,半乳糖-HCl 洗脱	17,000		UEA _I , L-岩藻糖 UEA _{II} 甲壳二糖	H(0)
草 蕨 (<i>Vicia cracca</i>)	NaCl-Tris 抽提, NaAC 沉淀去杂质, Sephadex G-100 层析, 或 Sepharose-A 血型物质亲和层析	10,000	4	D-Gal NAC	A
(<i>Vicia graminifolia</i>)	磷酸缓冲液抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, DEAE-纤维素层析, Sephadex G-150 凝胶过滤	105,000	4	N型红血球的主要糖蛋白, 酪蛋白, 糖肽, 颠下腺蛋白	N
多花紫藤 WFH (<i>Wistaria floribunda</i> var. <i>macrobotrys</i>)	NaCl 溶液抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, SE-Sephadex 层析, Sepharose 6B WFM 136,000 WFM 67,000	4 2	D-Gal NAC 甲壳二糖		

* 依照孙册: 生物化学与生物物理进展, 1981 年 3 期 15 页,略有删减。

件。蛋白质和酶溶剂提取后进一步分离纯化常用方法有如下几种：

- (1) 选择性变性除去杂质；
- (2) 分段盐析及有机溶剂沉淀；
- (3) 吸附色谱分离；
- (4) 多糖基离子交换色谱分离；
- (5) 凝胶过滤分离；
- (6) 亲和色谱分离；
- (7) 制备超离心分离；
- (8) 其他方法分离纯化以及后期结晶纯化等。

由于各类蛋白质和酶从细胞中提取分离后进一步纯化的方法选择及操作步骤繁简都不相同，很难作统一规程。但对于同一类的蛋白质，在提取分离上仍有许多共同点。例如病毒的提取分离常分为三步^[13,14]。

1. 病毒的提取 病毒寄主细胞经过物理或机械方法破碎后，常用中性缓冲液在4℃左右提取，大多数病毒在这一条件下比较稳定，pH 7.0, 0.1M 磷酸缓冲液，0.5M, pH 6.5 柠檬酸缓冲液使用较多。在提取中为了消除对病毒某些有害物质，还常加入一些还原剂（亚硫酸钠，巯基乙醇等）以抑制多酚氧化酶活力或加入一定量 EDTA 除去 Cu⁺⁺ 使多酚氧化酶不起作用。另加入 EDTA 除去 Ca⁺⁺ 和 Mg⁺⁺ 还可以使混在提取液中的核糖体降解以便于除去。

2. 净化提取液 粗提取液中，除含有病毒外，还包括有大量细胞碎片，每种各样的大分子和颗粒必须除去。常用方法有：3000—10,000g 低速离心，除去一些细胞碎片，细胞核、线粒体、叶绿体等大的颗粒，加入皂土、活性炭吸附除去色素及一些非病毒蛋白组份，用有机溶剂如氯仿、丁醇、乙醇等使寄主蛋白质变性，但对含脂质外膜的病毒应避免使用，将提取液反复冻融或 50—60℃ 加热 5—10 分钟，使杂蛋白质变性或凝聚再通过低速离心除去。

3. 从净化后提取液中进一步纯化病毒 除去了大部份色素和寄主蛋白质、细胞碎片以后，常选择如下一些方法进一步纯化病毒：

- (1) 聚乙二醇 (PEG 6000、12000) 或硫酸铵沉淀：植物病毒一般使用硫酸铵为 1/3 饱和度，如使用 PEG 6000 其浓度为 6% 左右(另加 3% 的 NaCl)。
- (2) 差速离心和超离心：差速离心先除去一些与病毒颗粒质量悬殊的组份，然后在 40,000—100,000g 下离心 1—2 小时，把病毒沉下，如此反复数次，即得到较纯的病毒。
- (3) 色谱分离：Sephadex G 200, DEAE 纤维素，CM 纤维素，磷酸钙凝胶等均可用于病毒的纯化，上柱与洗脱与一般蛋白质分离基本相同。

又例如凝集素 (lectin) 是一类能使红细胞凝集的蛋白质，广泛分布于植物及部分低等动物、哺乳动物和病毒中，现已查明凝集素近千种，绝大多数与糖分子共价结合。这上千种不同凝集素分离一般都是生理盐水或缓冲液提取(脂质多的材料需事先脱脂)，提取后比较老的工艺流程是硫酸铵分级沉淀(或乙醇分级沉淀)，离子交换色谱，分子筛凝胶过滤，超离心等。目前新的工艺主要是采用亲合色谱法，提取后含凝集素的混合液直接上 Sepharose 或 Sephadex 柱，或者通过固定化配体的亲合柱而纯化，配体包括糖蛋白、糖肽、单糖、双糖及其衍生物。一些凝集素的提取分离纯化方法见表 2-4。

二、核酸的提取分离

(一) 不同种类的核酸及其溶解性质

核酸分为 DNA 和 RNA 两大类。DNA 主要存在于细胞核内，核内 DNA 占整个细胞 DNA 量的 90% 以上，核外的 DNA 主要有线粒体 DNA (或植物叶绿体 DNA) 和质粒 DNA。RNA 主要存在于细胞浆中，其中微粒体中 RNA 约占细胞 RNA 总量 50%，细胞液中 RNA 约占总量 30%，其余便在核仁，线粒体及其他细胞器中。核酸是两性化合物，有一定等电点，能与金属结合成盐，又能与碱性物质结合形成复合物。在核酸大分子中，由于磷酸基的酸性和嘌呤、嘧啶基的碱性比较，酸性占优势，故其水溶液呈酸性。不论 DNA 或 RNA 都能溶于水，而不溶于乙醇等有机溶剂。

DNA 和 RNA 在细胞中常与蛋白质结合存在。这种蛋白质-核酸复合物是细胞结构的组成部份之一。根据蛋白质与核酸结合的不同可分为三种类型的核蛋白：(1) 核精蛋白——核酸与精蛋白结合而成，最初发现于动物精子中；(2) 核组蛋白——核酸与组蛋白结合而成，常存在于细胞核中；(3) 一般核蛋白。在这类核蛋白中，核酸结合的蛋白质大部份是非碱性蛋白，还有些细胞浆中的核蛋白是核酸与脂蛋白结合在一起。因此，细胞破碎后提取分离核酸，首先遇到的问题是如何把核蛋白与其他蛋白质分开，然后才进一步把核酸和蛋白质拆离。故最早提取分离核酸方法是在以蛋白质提取分离原理为基础上进行的。人们根据 DNA-核蛋白和 RNA-核蛋白溶解度的研究发现，在氯化钠浓度为 0.14M 时，脱氧核糖核酸蛋白的溶解度仅为水中的 1/100，当氯化钠浓度增加时，脱氧核糖核蛋白的溶解度逐渐增加，氯化钠浓度增至 1M 时，脱氧核糖核蛋白溶解度比水中大二倍。而核糖核蛋白在 0.14M 氯化钠浓度时仍有相当大溶解度。而当氯化钠浓度增大时，溶解度又相对减少。因此早期常用 0.14M 氯化钠提取核糖核蛋白，此时脱氧核糖核蛋白溶解度极少，从而与核糖核蛋白分开。反之提取脱氧核糖核蛋白时，则用 1M 浓度氯化钠溶液。由于各类核酸在细胞内分布不同，有时可事先将各部份细胞器分开，然后在不同细胞器提取所需的 DNA-蛋白或 RNA-蛋白，再进一步把核酸与蛋白质分离。这常称为二步法。近年来，由于分子生物学的发展，核酸制备技术突飞猛进，二步法提取核酸由于操作时间过长，核酸降解比较严重，现多采取一步法，即细胞破碎后，用苯酚一步提取核酸并同时除去蛋白质，中间不用把核蛋白分离。当然近年来核酸提取工作最大的进步，还在于克服核酸的降解作用以及采取了比较高效而又十分温和的方法除去所结合的蛋白质。因而所获得的核酸分子较大，活性较高。这里为了叙述上方便和系统起见，仍按核蛋白及核酸的提取分别予以介绍：

(二) 提取方法

1. 脱氧核糖核蛋白的提取^[16] 提取完整的脱氧核糖核蛋白常用方法有低离子强度盐溶液提取和高盐浓度溶液提取，对于细菌的脱氧核糖核蛋白则多用缓冲液提取。低离子强度溶液提取的优点是避免核蛋白暴露于高盐浓度中，引起蛋白质和核酸的分解，但低离子强度溶液不能抑制核酸酶的作用，常需加入酶的抑制剂。低盐溶液提取法，大致过程如下：

组织与 0.1M NaCl 和 0.05M 柠檬酸钠在 pH 7 匀浆，破碎细胞后， $2000 \times g$ 离心。然后用蒸馏水洗涤沉淀三次（用 0.004M NaHCO₃ 调 pH 至 7），除去电解质后所得粘稠沉淀与蒸馏水混合摇动提取，并放置过夜，次日离心后，取上清液，用 0.14M NaCl 沉淀即得脱氧核糖核蛋白。

高盐浓度溶液提取法则在第一步 0.14M NaCl 和 0.05M 柠檬酸钠破碎细胞，所得沉淀离心后，沉淀用 5% 的 NaCl 抽提，抽提液再加水至 0.15M 的 NaCl 浓度，使脱氧核糖核蛋白沉淀。

2. 核糖核蛋白的提取 核糖核蛋白的提取最常用的方法是以 0.14M 氯化钠抽提，此时核糖核蛋白是可溶性的，而脱氧核糖核蛋白留于细胞固体组份或沉淀中。离心后，上清液用乙酸调 pH 至 4—5 之间，核糖核蛋白被沉淀下来，即得包括 tRNA 蛋白在内的各种核糖核蛋白沉淀。此外，提取细胞质中的核糖核蛋白及植物病毒中核糖核蛋白，有时也采用分步差速离心法和硫酸铵分步盐析法，其原理与操作与一般盐析法及离心法相同。

3. DNA 一般提取方法 从 DNA-蛋白中提取分离 DNA，是解离 DNA 与蛋白质结合，使 DNA 释出的过程，饱和氯化钠溶液、高浓度高氯酸盐、氯仿、阴离子去污剂、苯酚等均可使 DNA 与蛋白质解离。饱和氯化钠法由于提取时间很长及蛋白质沉淀不完全，实际上应用很少。用 5M NaClO₄ 解离 DNA-蛋白，然后在 30% 蔗糖中超离心分离 DNA 与蛋白质，在提取某些噬菌体 DNA 是成功的^[17]。但应用最广泛的还是氯仿法、去污剂法和苯酚法。现分别介绍如下：

(1) 氯仿法：氯仿法提取核酸最早的是由 Sevag 等人于 1938 年首先提出^[18]，其方法主要过程如下：

培养 18 小时的 *Streptococcus p.* 的菌体悬浮液，经超声波破碎细胞后，离心，取上清液，用 0.1N HCl 沉淀上清液中的核蛋白，再离心取沉淀，溶于水中，调节 pH 7.0 离心。上清液用等体积 95% 乙醇处理，离心除去不溶物。加入 0.1N HCl 至核蛋白沉淀，再离心，沉淀以 95% 乙醇洗涤二次，后将沉淀溶于水中，调 pH 7.0 滤除不溶物。然后添加 0.5% Na₂CO₃，于 50—55℃ 水浴加热，1—2 小时。冷却离心取上清液并调 pH 7.0，加入 0.25 体积氯仿和 0.1 体积戊醇，振荡 60 分钟。离心后，上层为水层（含核酸），下层为蛋白质胶状物和氯仿层。

Sevag 的氯仿法提取的核酸，含有 DNA 和 RNA 二种成份，加热和 0.1N HCl 都能使核酸产生降解现象，但其优点是除蛋白质比较完全，故一直为人们所重视。1946 年 Mecarty 和 Arery 对此法进行了改良^[19]，主要用 0.1M NaCl 和 0.1M 柠檬酸钠和去氧胆酸钠破碎细菌细胞，从而抑制了核酸酶活性。另外还加入 RNase 消化 RNA，用 Ca⁺⁺除多糖，使氯仿法逐渐趋成熟。以后又经多人改进，直至 1961 年，Marmur 总结了用氯仿法提取 50 多种细菌核酸的经验，此法才逐渐被广泛应用^[20]。Marmur 法主要步骤包括用含有 EDTA 溶液洗涤细菌 → 用十二烷基磺酸钠和溶菌酶破碎细胞 → 加入过氯酸钠至 1M 浓度分离蛋白质和核酸 → 以等体积氯仿—戊醇振荡 30 分钟 → 吸取水层加两倍体积乙醇沉淀核酸 → 沉淀再溶于柠檬酸盐溶液中，反复以氯仿—戊醇振荡提取，直至除净蛋白质 → 加入核糖核酸酶消化 RNA → 最后在含有柠檬酸盐和 EDTA 的溶液中，滴加 0.54 体积的异丙醇或乙醇以沉淀 DNA。目前氯仿法除应用于细菌 DNA 提取外，植物和动物组织也常应用此法。当然许多具体细节上已有了改进^[17, 21]，但基本原理及

过程和 marmur 报告大致上是相同的。

(2) 去污剂法：去污剂法早在三十年代已经有人提出，但直到 1951 年以前此法并无太大进展。1952 年，Key 等人对此法作了详细的介绍^[22]，才逐渐被人们所重视。1957 年 Zamenhof 报道在动物组织中制备 DNA 时，使用 0.1M 柠檬酸钠（或 0.1M EDTA）充分洗涤组织及破碎细胞，然后以 2M NaCl 抽提，乙醇沉淀后，所得的核蛋白在标准缓冲液（0.14M NaCl + 0.01M 柠檬酸钠）中加入乙醇-十二烷基硫酸钠混合液，搅拌使核蛋白解聚。在解聚后的 DNA 和蛋白质溶液中加入固体 NaCl，使最终浓度为 5%，沉淀蛋白质及去污剂，离心后的上清液，再以乙醇沉淀 DNA，反复在标准缓冲液中以去污剂去蛋白，最后得到具有活性的 DNA 产品，以上方法已应用于小牛胸腺、脾脏、鸡的红血球等材料的 DNA 提取分离^[23]。许多去污剂都具有溶解细胞，使蛋白质和核酸解离，抑制核酸酶的活性，调节各类核酸在酚相及水相的溶解度等作用。常用的去污剂有十二烷基硫酸钠（SDS），十二烷基硫酸锂（LDS），脱氧胆酸钠，4-氨基水杨酸，三异丙基碘酸钠，萘-1,5 二碘酸钠，二甲苯碘酸钠等。实际上，目前单独使用去污剂法提取分离核酸，除超离心法外[如提取噬菌体（G）DNA——以 5% 浓度 SDS—0.1M EDTA 提取，于 CsCl 中超离心分离 DNA]。一般多和苯酚法、氯仿法或其他方法结合使用。如用苯酚抽提核酸时，水相为 RNA 和多糖，DNA 和蛋白质留在酚层或两相交界处，但在 1% SDS 或 6% 的对氨基水杨酸存在下，可将 DNA 和 RNA 同时提到水相（0.1% 的 SDS 只能将 RNA 提到水相）。萘-1,5 二碘酸钠与酚法结合使用时，可将 tRNA、rRNA 提到水相，而把 DNA 和 mRNA 留在酚层。

(3) 苯酚法：苯酚法是近年来较流行的一种提取核酸方法。早期由 Westphal 等人（1952）用酚和水混合液处理细菌分离多糖时，发现多糖和核酸留于水相，而蛋白质溶于酚相。1956 年 Kirby 用此法提取了 RNA^[24]。接着 1957 年，Kirby 又将此法作了改进^[25]。方法是：鼠肝与 6% 对氨基水杨酸做成匀浆，然后用 90% 酚水混合液抽提，使 DNA 与 RNA 同时进入水相，再用 2-乙氧基乙醇沉淀 DNA。DNA 与 RNA 的分离采用加入核糖核酸酶降解法。多糖的除去采用在浓磷酸盐存在下的 2-甲氧基乙醇抽提法（多糖溶于下面水相，DNA 溶于上面有机相）。以后，Kirby 又对酚法作了多次改进^[26,27]，为酚法提取 DNA 奠定了基础。苯酚法可用于 RNA 和 DNA 的提取，由于其溶解蛋白质能力强，对核酸酶具有一定抑制作用，并可以不经分离核蛋白直接从细胞匀浆中提取分离核酸，抽提后留在水相残余的酚很易被乙醚洗除，以及所获得的核酸分子也较完整等，故在核酸提取中是一种比较受人欢迎的方法。

(4) DNA 提取实例：DNA 提取分离方法文献资料很多，很难一一介绍。现就上述几类主要方法，现举例说明如下：

例一，豆胚芽 DNA 的提取分离^[28]：豆胚芽收集后，用蒸馏水充分洗净，500 个豆胚轴加入 2 毫升 pH 7.5 的 0.5M NaCl（内含 0.1M EDTA）再加入 40 毫克链丝菌蛋白酶及 5 克蔗糖。研磨破壁，匀浆溶于 50 毫升 0.5M NaCl—0.1M EDTA 溶液（内含 5 毫升 20% SDS）中，37℃ 保温 4 小时。后加入等量氯仿-异戊醇（40:1）混合液振荡 30 分钟，10,000 转/分下离心 10 分钟，上清液两次用等量氯仿-苯酚（1:1）混合液振荡，离心取上面水相。加入等量乙醇沉淀 DNA。用玻棒搅集后再溶于 10 毫升 0.15M NaCl—0.015M 柠檬酸三钠溶液（pH 7.0）中，同时按每毫升 2 微克及 0.006 微克的量分别加入核糖核酸酶

A 和噬菌体 T₁ 核糖核酸酶，37℃ 保温 60 分钟。接着用 50 微克/毫升的链丝菌蛋白酶 37℃ 处理二小时。此混合物溶液再用氯仿—苯酚(1:1)反复抽提，除去 RNA 及蛋白质，最后用乙醇沉淀 DNA。

例二，短小芽孢杆菌抗药性质粒 pCJ 3 的分离^[29]: 37℃ 振荡培养的细菌至对数期，收集菌体，以溶菌酶及 SDS 先后处理，将破壁裂解后的粘稠物加入 5M NaCl 至浓度为 1M，以沉淀染色体 DNA。置冰箱过夜，取出于 0—3℃ 离心(17,000—20,000g)一小时，取上清液加入 10 μg/ml 核糖核酸酶消除 RNA。继加入固体聚乙二醇 (MW 6,000) 至 10% 浓度 (W/V) 沉淀质粒 DNA。0—3℃ 放置 20 小时以上，离心 (600g) 2 分钟得沉淀。将沉淀悬浮于 40% (NH₄)₂SO₄—0.05M Tris·HCl (pH 8.0)—0.05M NaCl—5mM EDTA 中，离心 (3500 转/分) 10 分钟除去液面的悬浮物及聚乙二醇和下面的蛋白质沉淀。将溶液以 50mM Tris—HCl (pH 7.5)—5mM EDTA—5mM NaCl 低温透析过夜。透析液用酚抽提三次后再用氯仿抽提三次。最后以 50mM Tris—HCl (pH 7.5)—20mM NaCl—10mM MgCl₂ 透析一次。取出用紫外分光光度计测定含量后置 4℃ 保存。

所得的质粒 DNA 经电镜观察，并依电镜照片用图形数字转换器测定质粒 DNA 分子的长度，除以放大倍数得到各个分子实际长度，然后从平均长度计算出 pCJ3 的分子量 4.33×10^6 。

〔注〕本文质粒分离的主要根据下列文献的方法略加修改：

- (1) Guerry, D. J. et al.: *J. Bacteriol.* 116: 1064, 1973
- (2) Hympherys, G. O. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 383: 457, 1975
- (3) Johnson, J. B. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 75: 13, 1977

例三，酵母线粒体 DNA 的提取分离^[30]: 酵母原生质体在 0.15M NaCl—2.5% SDS (pH 7.0) 中 60℃ 保温搅拌一小时，溶解后加入氯化钠至 1M 浓度，在冰浴中过夜。次日离心后取上清液，加一倍体积 95% 乙醇沉淀。离心分离，沉淀再溶解于 1M NaCl 溶液中，如此反复处理数次。然后用 15% SDS 和氯仿处理去除蛋白，再按 Bernardi 法^[31]，上羟磷灰石柱 (HA 柱) 进行吸附，洗脱后可得两个峰。第一个峰为核 DNA，第二个峰为线粒体 DNA。

4. RNA 的一般提取方法 RNA 的提取方法一般有酚法，去污剂法和盐酸胍法等，这些方法都可以用来提取具有生物活性的核糖核酸。此外，工业上还常用稀碱法和浓盐法提取酵母 RNA^[32]。用稀碱法和浓盐法所提取的核酸均为变性的 RNA，主要用作制备核苷酸的原料，其工艺比较简单。稀碱法使用 1% 氢氧化钠使酵母细胞裂解，使核酸稀放出来。然后用盐酸中和，除去菌体，水溶液中的 RNA 用酸调 pH 2.5，即沉淀得核糖核酸粗品。浓盐法是在 10% 氯化钠溶液 90℃ 提取 3—4 小时，然后提取液经离心后以乙醇沉淀 RNA。下面主要介绍提取具有生物活性 RNA 的几种方法：

(1) 盐酸胍法^[33] 用盐酸胍提取分离 RNA 是五十年代提出的，早期由于各实验使用盐酸胍的浓度不同，所得到 RNA 分子量大小差别较大，后来证明 4M 盐酸胍不仅可以使蛋白质变性而与核酸分离，而且还有有效地抑制了核糖核酸酶。但 2M 浓度的盐酸胍则不能很好地抑制 RNase，故所得 RNA 分子量较低。如使用其他抑制剂配合 2M 盐酸胍提取分离，也可以获得较高分子量的 RNA。如 1959 年 Reichmann 和 Stace-Smith 曾成功地用 2.5M 盐酸胍加 0.005M EDTA 提取了土豆病毒 X 中具有感染性的 RNA^[34]。盐酸胍法也可用于 DNA 的提取，如 Widnell 和 Tata 曾用 6M 盐酸胍提取大鼠细胞核

中 DNA，但具体例子不多。总的来说，盐酸胍是提取分离 RNA 的一种方法，但不如酚法和去垢剂法效果好，故应用不广。

(2) 去垢剂法：去垢剂不仅广泛应用于 DNA 的提取，也普遍应用于提取各种 RNA。其中使用最多的是十二烷基硫酸钠(SDS)，使用浓度范围为 0.5—2%，早期单独使用此法提取动物组织的 RNA 和植物病毒的 RNA 取得一定成功，但除去蛋白质不完全。近年来多与酚法、氯仿法、超离心法结合提取不同材料的 tRNA、rRNA、mRNA 获得十分良好的效果。其中尤以去污剂-苯酚法最受欢迎，其例子将在酚法中介绍。这里简要地提一提 Key 和 Dounce^[35] 以及 Fraenkel-Conrat^[36] 单独使用去垢剂提取动物和植物病毒 RNA 的大致过程：

从动物肝脏中提取 RNA 的主要过程如下：动物杀死后，尽快将组织在冰浴中冷却，并在 0.9% NaCl（内含 0.01M 柠檬酸钠）溶液中做成匀浆。离心后，上清液以 1N HCl 调 pH 4.5，离心取沉淀再溶于 0.9% NaCl 中。加入 2% SDS 溶液去蛋白质，以 10% NaOH 调 pH 7.0 搅拌 3 小时。后加入 NaCl 至 1M 浓度抽提，离心后取上清液，用 2 倍乙醇沉淀 RNA。用 SDS 去蛋白可反复进行，直至 RNA 达到所需纯度。

从烟草花叶病毒 (TMV) 中提取 RNA 的主要过程如下：将 4 体积 1% TMV（内含 10⁻⁴EDTA）在 50°C 及 pH 8.5 下，加入 SDS 使最终浓度为 1%。搅拌 5 分钟，冷却后，以 33% 饱和度硫酸铵沉淀蛋白质，离心后的上清液于冰箱中过夜使 RNA 沉淀，第二天离心后，再将沉淀溶于水中，加入几滴 pH 5.0，3M 醋酸缓冲液，并以二倍体积乙醇沉淀 RNA。最后将沉淀溶于水中，用超离心法除去病毒及凝集物，即得 RNA 水溶液。

(3) 苯酚法：苯酚法用于提纯 RNA 先于 DNA，现仍是分离提取 RNA 最好的方法，此法可以单独使用或与其他方法结合使用，广泛用于各种 RNA 的提取。根据其使用条件及与其他方法结合情况可分为冷酚法、热酚法，皂土-酚法、去垢剂-酚法等，其中热酚法多用于植物组织及病毒 RNA 的提取，主要由于这些材料细胞壁及外壳比较坚硬，脂质较多，必须升高酚的提取温度，才能使 RNA 释放出来。皂土-酚法和去垢剂-酚法，有利于抑制 RNase 的作用及解离蛋白质与核酸的结合，使蛋白质变性而除去。各种方法的综合使用是目前提取核酸最常用和最有效手段，其原理通常是相互取长补短，以便获得更纯更完整的核酸分子，满足分子生物学对核酸分子结构和功能方面研究越来越高的要求。由于 RNA 酚法提取的应用十分广泛，资料甚多，下面简单地介绍几种以说明此法应用的大致过程：

(4) 酚法提取 RNA 实例

例一、植物组织 RNA 的提取分离^[37]：新鲜植物组织在溶液 A (1 克 SDS 溶于 100 毫升 0.1M Tris 缓冲液内含 5×10^{-3} M EDTA 和约 1 克皂土并调 pH 7.4) 中。加砂(酸处理过)研磨成匀浆(不同组织有时须变动破碎细胞方法)。将一倍体积的酚先预热 60°C，再倒进组织匀浆，维持此温度 3 分钟并不断振荡(某些难提取的植物组织需提高至 70°C 并延长提取时间)。然后迅速冷却和离心，使悬浮液分成二相。取出上面水相，再加入溶液 A 反复抽提酚层。合并水相后，用乙醚洗涤数次，除去水相残余的酚。然后以二倍体积预冷的 95% 乙醇沉淀 RNA。

例二、大肠杆菌中 tRNA 的提取：tRNA 分子量小，在 105,000g 离心后常存在于上清液中而与微粒体的核蛋白很易分开，故提取方法早在六十年代已解决，现已能十分简便

地大规模制备，下面主要以大肠杆菌中 tRNA 的提取为例，说明目前常用酚法的基本过程。

对数生长期的大肠杆菌菌体——破壁酚处理去蛋白质，水相以乙醇沉淀 RNA 并除去低分子量物质和酚——沉淀用 1M NaCl 抽提使 tRNA 和大分子 RNA 分离——进一步提纯用异丙醇沉淀或上 DEAE-纤维素进行吸附分离^[38]。每公斤大肠杆菌细胞可得 2~2.5 克 tRNA。

例三、大鼠肉瘤-180 腹水细胞肌动蛋白 mRNA 的提取分离^[39]：收集感染 6—8 天后的大鼠肉瘤-180 腹水细胞，在完全培养液中培育 1 小时后，用 Tritonx-100 在低离子强度下破碎细胞，并以镁盐沉淀法从原生质体中分离得聚核糖体^[40]。聚核糖体悬浮于 50mM KCl, 1mM MgCl₂ 和 50mM Tris-HCl (pH 7.6) 缓冲液中，于液氮或 -85°C 处存放后，按 Brawerman 法^[41]在碱性 pH 下用酚提取分离 RNA。酚层再用 0.1M Tris-HCl (pH 9.0) 抽提。合并水相，再用酚—氯仿—异戊醇 (1:1:0.1) 反复抽提，使二相界面无蛋白质为止，取出水相加 NaCl 至 0.1M 及 2.5 倍体积的乙醇，4°C 过夜。次日离心收集沉淀，以 66% 乙醇及 0.1M NaCl 洗涤。用乙醚除乙醇，再溶于水中，吹风除乙醚，所得的聚核糖体 RNA 存放于 -20°C 下，待进一步分离 mRNA。

将上面所得聚核糖体 RNA 和 oligo-(dT)-纤维素在室温中混合（加入 500mM NaCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, pH 7.6 和 0.1% SDS），吸附 30 分钟后离心。并用上述缓冲液洗涤二次，每次离心后的上清液合并。用 0.1M NaCl 和 2.5 倍乙醇沉淀 Poly(A)⁺RNA。然后用水连续地洗下被 oligo-(dT) 所吸附的 Poly(A)⁺RNA，收集后用上述乙醇—盐沉淀。

Poly(A)⁻RNA 的进一步纯化，可以用 3—30% 蔗糖密度梯度离心（介质中含 10mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1% SDS），使用 Sw-27 Spinco 转子，在 23,500 转/分下离心 17 小时，Poly(A)⁻RNA 在 18S 处被纯化。

例四、T₄ 感染的大肠杆菌中 RNA 的提取^[42]：

T₄ 感染的细胞 4 毫升按 Hagon 和 Young 法加入 0.5 毫升 SDS 提取缓冲液（内含 0.5M Tris, pH 6.8, 0.02M EDTA, 10% SDS）在沸水中加热 2 分钟，破碎细胞。然后在提取液中加入醋酸钠 (pH 5.2) 至最后浓度 0.2M，接着用酚和氯仿混合溶剂抽提，离心后取上层水相，以乙醇沉淀。离心后收集沉淀再溶于 Tris-Mg⁺⁺（各为 0.01M, pH 7.0）缓冲液中，加入 DNase（用前经碘代乙酸盐处理）至最后浓度为每毫升 10 微克。在 37°C 保温半小时，加入醋酸钠至 0.2M，再用氯仿抽提除去 DNase，上层水相用乙醇沉淀 RNA。

(5) 其他提取具有生物活性 RNA 方法：除上述几种外，还有热处理法，曾用于制备具有感染性的 TMV-RNA^[43]。氟碳化合物法，曾用于制备某些肿瘤细胞中的 RNA^[44]。因目前应用不广，这里就不再详细举例说明。

核酸的提取分离、纯化，其技术方法进展极快，日新月异，不胜枚举。仅就提取或溶剂分离方法来说，近年来发展特点主要有如下几方面：

第一、分离提取方法更趋简便快速。例如 1978 年 Darnoboin 和 Doly 介绍一种快速碱抽提法分离质粒 DNA，一天之内可提取 100 多个质粒样品，只要一个人操作。方法十分简单，将培养的大肠杆菌用溶菌酶破壁后，以 SDS-NaOH 处理菌液使 pH 达 12~12.5，

此时染色体 DNA 变性而质粒 DNA 不变性，再用高浓度酸性醋酸钾—醋酸中和菌液，已变性染色体 DNA、大分子 RNA 和蛋白质-SDS 复合物均沉淀下来，离心后上清液用无水乙醇沉淀即可获得纯度很高质粒 DNA，有少量 RNA 可用 RNase 除去。又如分离噬菌体 DNA 时，在离心管底层放置 5M NaClO₄，上层小心铺盖 30% 蔗糖，并加入已破碎菌体。由于 30% 蔗糖层只让噬菌体通过到达管底，遇到 5M NaClO₄ 后，噬菌体内 DNA 即释放出来，再经低速离心除去一些杂质碎片，所得 DNA 失活少且产率很高。此法只要有超离心设备，几分钟即可把噬菌体中 DNA 提取出来。

第二、提取高活性大分子核酸时，条件要求更加温和，实验设计更加合理。在操作上强调温和，对提取大分子核酸（特别是 DNA）也是近年来技术改革一个方向。例如，为了避免切力作用，尽量不用吸管和滴管或改用大口吸管；改用缓冲液而不用酸碱进行中和；破碎细胞时要求低温、短时，使用高剂量溶菌酶等等，都直接关系到所提取的大分子核酸的活性大小。在使用各种溶剂提取核酸时，条件也越来越具体细致，包括各种缓冲液、变性剂、去污剂和核酸酶的抑制剂如何搭配，谁先加谁后加均极讲究。以其中酚试剂提取核酸为例，不同 pH 值，不同缓冲液或试剂饱和酚以及不同摇荡次数，对各种核酸的提取其效果差别很大，如 0.1% SDS-酚提取，只能将 RNA 提到水相，1% SDS-酚提取时，可将 DNA、RNA 同时提到水相；中性酚无法将含有多聚 A 的 mRNA 提到水相，但 pH 8.5 以上或加入少量氯仿的酚，即可把 mRNA 提到水相；用 Tris-HCl 饱和酚提取细菌质粒 DNA，剧烈振摇 20 次以上和轻轻的上下把试管颠倒三次，被提取的内含物差别很大，前者包括染色体 DNA、质粒 DNA、RNA 和蛋白质全部被提出，后者只有质粒 DNA 和少量小分子内含物被提取。

最后，分离提取阶段防止核酸酶（主要是 RNase）的作用仍是一个棘手问题。由于 RNase 很难失活，使制备完整的 RNA 分子遇到很大困难，如提取大分子 rRNA 和 mRNA，常常未纯化就被 RNase 降解。使用过的抑制剂如 SDS、皂土、肝素、精胺、核苷-钒复合物、蛋白酶 K、Macaloid（一种复合硅酸盐）和二乙基焦碳酸（DEP）等，均未能完全抑制 RNase 的活力。新的更有效的方法还不断研究中。

以上主要指核酸的提取方法而言，至于核酸提取后的纯化包括沉淀法、超离心法、各种色谱法、电泳法、免疫法和分子杂交法等，其种类之多、内容之广，要讨论其发展方向及每一方法具体内容，已超出本书篇幅范围，读者可参阅有关核酸研究文献。但核酸——作为生化物质中的一大类，此处从历史到现状把不同类型的核酸提取方法作一简单介绍，并列举一些例子，其目的是使读者了解一些主要核酸提取方法原理，并不意味着这些例子是最新的和完满的方法。当然其中不少是很有价值的现在仍有普遍应用的意义。

5. 核酸提取时注意事项及提取后进一步纯化 这里主要指提取具有生物活性的核酸（包括 DNA 和 RNA）都必须注意如下几个问题：

- (1) 选用的材料必须要新鲜，材料的预处理不要时间太长。
- (2) 整个提取分离过程，除注明在某一温度下进行外，一般均维持 0—4℃ 中进行操作。但不同材料和不同方法对温度要求的严格程度也不等。
- (3) pH 要适当，除特别注明在某步骤需要比较高或低的 pH 值外，一般在中性附近进行。
- (4) 避免强烈的理化因素作用。如局部过酸过碱、过热，以及强烈机械切力，及剧烈

搅拌等。特别对大分子量的 DNA 或 mRNA 等的提取尤须注意。

(5) 防止核酸酶的作用，是十分重要的问题，从材料预处理，细胞破碎直至提取分离纯均注意抑制核酸酶的作用。

核酸提取后的纯化工作，由于各类核酸性质的不同，牵涉的讨论面比较广。除和核酸相结合的蛋白质和性质相似的多糖的分离方法大致相同外，不同种类及不同大小的核酸的分离仍是一个十分复杂的问题，如闭合环状 DNA (质粒 DNA) 与染色体 DNA 的分离，主要根据二者变性的难易。采取 CsCl-EB (菲啶溴红——一种核酸染料) 密度梯度离心法、硝酸纤维膜吸附法或聚乙二醇沉淀法、聚乙二醇—葡萄糖二相分配法而分离。mRNA 与其他 RNA 的分离主要根据真核细胞中 mRNA 末端常含 PolyA 顺序，利用这一特点，而采取 Oligo(dT) 纤维素或 PolyU-琼脂糖特异性吸附 mRNA 与其他 RNA 分子分离，这是一个十分简便和有效方法。但末端没有 PolyA 顺序的许多原核细胞 mRNA 的纯化，则不能采取上述方法，只能用一般比较繁琐的分子杂交方法。tRNA 由于分子量较小，与其他大分子 DNA、RNA 的分离，方法则比较简单，如用 20% 甲氧甲酚 (Cresol)，0.54 体积的异丙醇，1M NaCl 或 43% 饱和度硫酸铵均可以沉淀除去 DNA 及 RNA，上清液中回收 tRNA。除了以上所述一些特殊方法外，许多带有共性的核酸纯化方法如梯度超离心法，分子杂交法，柱层析法，琼脂糖凝胶电泳法等。均可根据不同对象采取不同条件进行实验。以上共性分离纯化方法，在 Cantoni 和 Grossman 等人所编著的核酸研究方法手册中已有详尽的介绍，读者有兴趣时，请参阅 [45, 46]。

三、脂类化合物的提取分离

用热乙醇或乙醚抽提生物组织可得到油状物，它包括脂肪、蜡、磷脂、糖脂、固醇及它们的水解产物(如高级脂肪酸)，这些物质虽结构功能不同，但都属于油脂类化合物，都能溶于脂溶性溶剂中。脂类化合物可分为中性脂肪和类脂二大类。中性脂肪的比重都小于 1.0，不与水相混溶，但都溶于乙醚、氯仿、丙酮、苯、二硫化碳、热酒精及其他脂肪溶剂中。类脂主要有磷脂、脑苷脂、固醇及蜡等。磷脂也是一种甘油脂，但不同于中性脂，主要是甘油上的三个羟基其中有一个不是与脂肪酸结合，而是与磷酸胆碱等相连，不同的磷脂具有不同的溶解性质，如脑磷脂不溶于丙酮而溶于氯仿及乙醚，卵磷脂不溶于冷乙醇而溶于热乙醇，神经磷脂则不溶于乙醚。这些溶解性质的差别常作为提取分离磷脂类化合物的依据。固醇类化合物都不溶于水(仅在水中溶胀或形成乳胶状物)，而溶于有机溶剂。固醇类化合物中因无脂链的存在，故在碱性条件下不能发生皂化反应，可用皂化法使固醇与脂肪分开，又因固醇类化合物都比较容易结晶，故从生物材料中提取制备并不十分困难。

油脂化合物的提取分离方法常有下面几种：

1. 机械压榨法 主要通过各种压榨机在 10—100 公斤/厘米² 的压力下，将流动性较大的油从材料破碎的细胞中挤压出来，这种纯属于物理的方法常用于一些油料作物种子的制油，如花生油，棉子油的生产等。

2. 水代法 这是我国劳动人民几千年前制造的一种简便取油法，其原理是以水代油。因油料细胞中蛋白质亲水性强，而油的疏水性强，在热的条件下加入大量的水，剧烈搅拌，水进入细胞与蛋白质结合而将油顶替出来。此法设备简便，成本低廉，生产安全而

出油率高。驰名中外的小磨麻油就是用此法提取的。

3. 皂化法 甘油酯易与碱(如氢氧化钾或氢氧化钠)作用而水解生成能溶于水的脂肪酸钠或钾(即肥皂)和甘油,此过程称为皂化。皂化液再经酸化处理,即分离析出高级脂肪酸。不被皂化部份如固醇等通过皂化反应后与甘油酯分开,再进一步用有机溶剂提取纯化。

4. 有机溶剂萃取法 是实验室常用的一种比较精细的分离方法,它主要根据不同油脂化合物,在不同溶剂和不同条件下溶解性质的差别而进行分离。有机溶剂萃取的实验仪器及操作方法都比较简单,在各种有机化学实验指导中都有描述,这里不再作介绍,而各种脂类化合物的溶剂系统分离法可参考图 2-3^[47],图 2-4^[48]。图 2-3 是一般生物材料在不同溶剂中系统分离;图 2-4 是一种抗酸菌的菌体内不同脂类化合物在不同溶剂的系统分离情况。

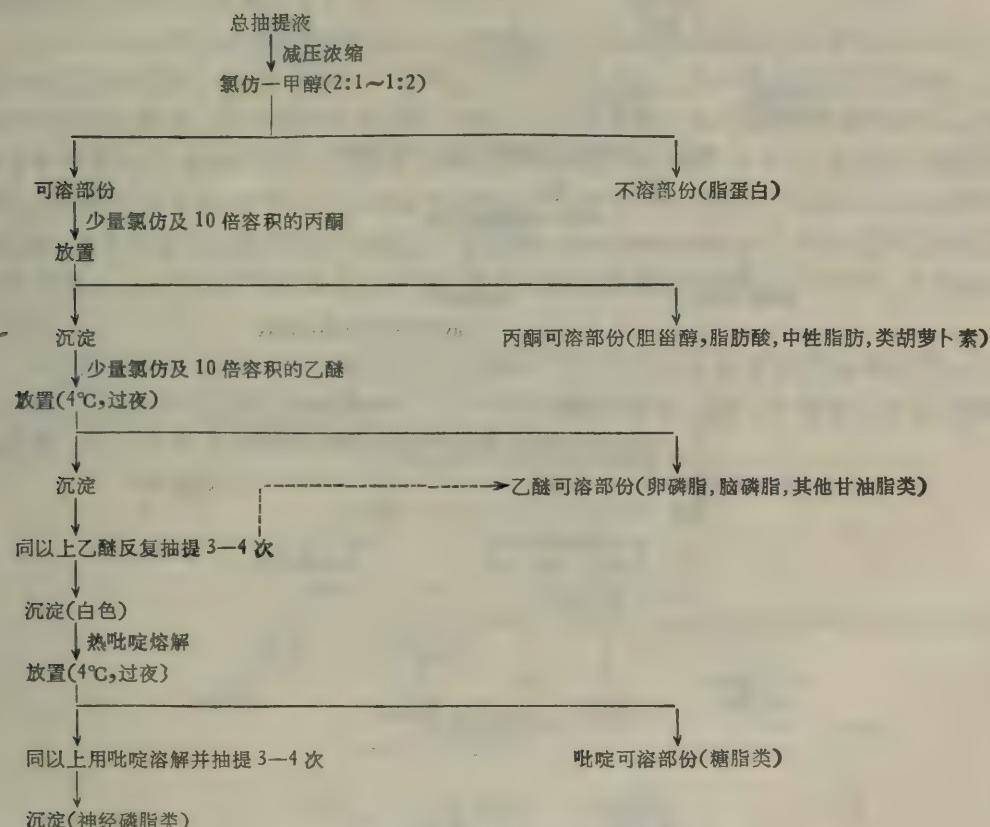


图 2-3 脂类化合物有机溶剂系统提取分离示意图

四、其他脂溶性生化物质的提取分离

除上面所说的脂类化合物外,生物体内还有许多非脂类物质,它们不溶或难溶于水,而易溶于有机溶剂。如植物组织中的不含酚羟基的醌类、内酯类、皂甙类和大部份生物碱都属于脂溶性物质。常用氯仿、乙醚、热乙醇、甲醇、甲苯、乙酸乙酯等有机溶剂分别提取。

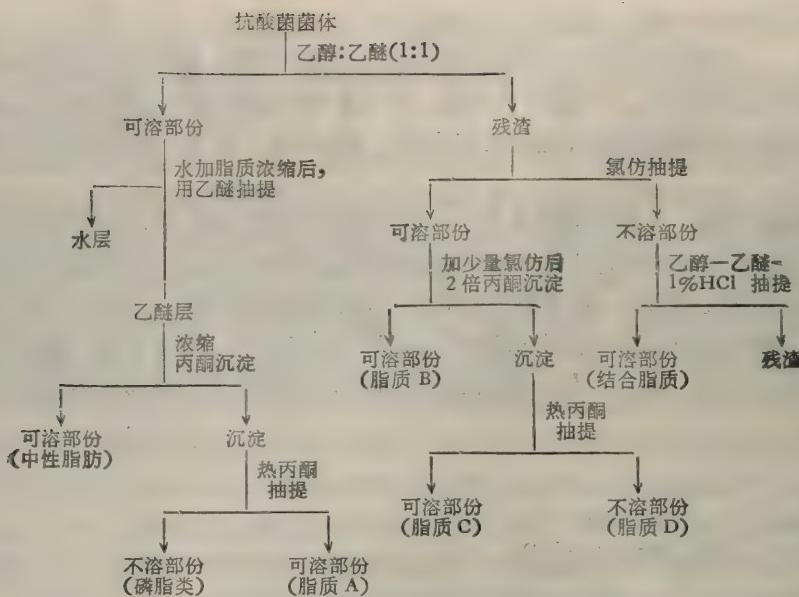


图 2-4 抗酸菌菌体脂质的系统分离示意图

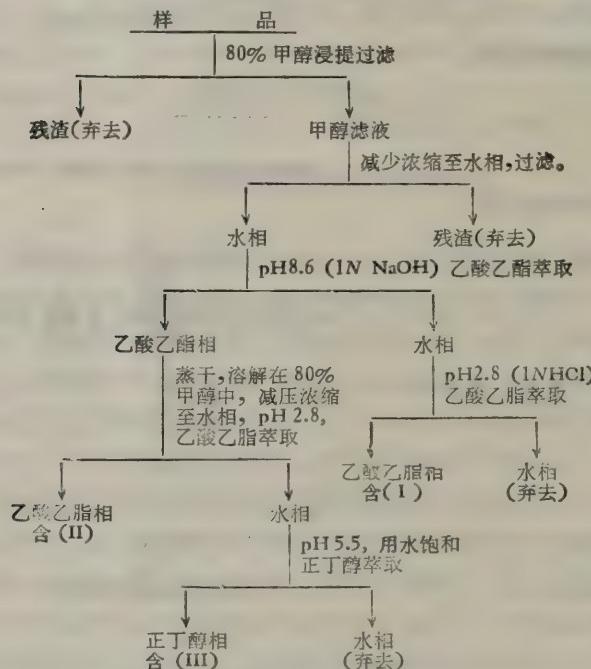


图 2-5 植物样品几种植物激素的提取分离示意图

图中 (I) 含 IAA、ABA、GA, (II) 含中性生长素, (III) 含细胞分裂素

由于这些化合物种类繁多,本章只能扼要地提及,详细介绍他们的分离方法请参阅有关植物成份化学的专著。

此外,许多植物激素如吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)及细胞分裂素等,这些物质均具有极高的生理活性,对植物的生长、开花、结实等均有明显的影响,在农业生产上应用较广,这些物质,其分子都具有非极性基团,可溶于甲醇、乙醇及乙醚等

有机溶剂中。但分子中也有某些极性基团，因此又可溶于一定 pH 的水溶液中。根据它们的溶解度的共性，一般先用五倍于材料的 80% 甲醇提取后，再通过改变 pH 条件及改用不同溶剂抽提使各组份分开。其系统分离见图 2-5^[49]。

以上几种植物激素提取初步分离后，进一步纯化时，常用离子交换树脂柱色谱（包括使用强酸性树脂 Dowex 50 或强碱性树脂 Amberlite IRA-400）或用 DEAE 纤维素分离。

五、糖、氨基酸及其他水溶性生化物质的提取分离

游离单糖及小分子寡糖易溶于水，材料破碎以后，用水或在中性条件下以 50% 稀乙醇进行搅拌提取，提取液以醋酸铅除去蛋白质及其他杂质，铅离子可通过 H₂S 而除去。然后浓缩至干，再用沸甲醇或热乙醇抽提，冷却后单糖便结晶析出。单糖或小分子寡糖也可在提取后，用吸附柱色谱或离子交换法而纯化。

大分子的多聚糖或杂多聚糖情况则比较复杂，应依照不同种类的多糖的具体溶解性质而决定提取方法。如昆布多糖、果聚糖、糖原、易溶于水。壳多糖纤维素溶于浓酸。直链淀粉易溶于稀碱。许多具有医药价值的酸性粘多糖常含有氨基己糖、己糖醛酸，以及硫酸等多种成份，其结构种类复杂，并常与蛋白质结合在一起，提取分离时，先用蛋白酶破坏蛋白质与糖的结合后，再将水提取液减压浓缩，以乙醇或十六烷基三甲基溴化铵沉淀酸性粘多糖，最后用离子交换树脂柱色谱进一步纯化。Danishefsky 和 Bell 等曾用不同浓度的稀氯化钠，从人的肚脐带提取了几种含有透明质酸和软骨素的酸性粘多糖^[50]。其方法如图 2-6。

SA 经 Dowex I 分离所得 SAA、SAB、SAD 三个组份均含有葡萄糖胺、糖醛酸，但所含硫酸基及蛋白质差别较大。SB、SC 所含葡萄糖胺较微量，其中 SB 含半乳糖胺及硫酸基较多。P-I, P-II 部份也以半乳糖胺为主要氨基己糖组份。

500 克组织用 0.2% NaCl 在 0—5°C 匀浆 5 分钟并用 0.2% NaCl 提取(5°C)一天

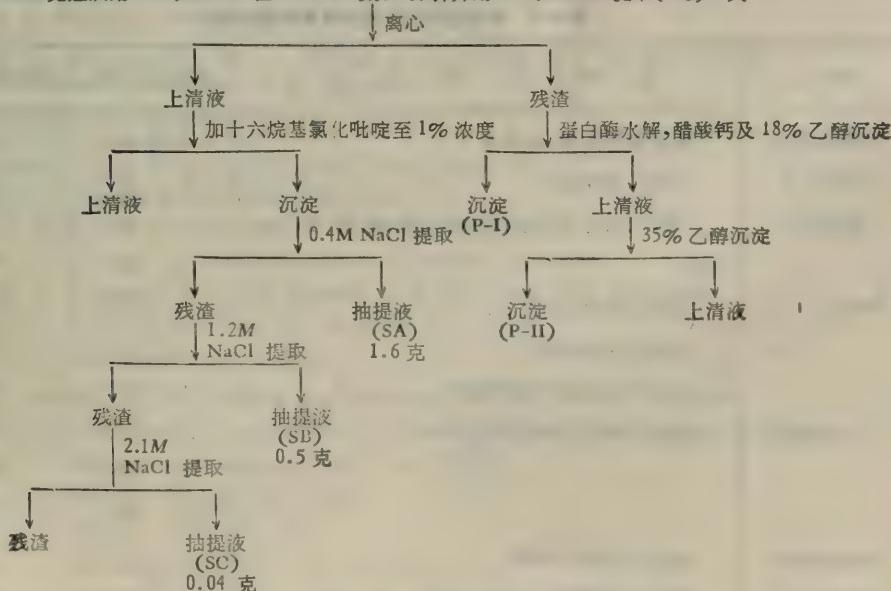


图 2-6 从人肚脐带提取几种酸性粘多糖图解

肝素也是一类酸性粘多糖，水解后生成葡萄糖醛、氨基葡萄糖及硫酸，临幊上用于各种血栓栓塞。肝素易溶于水，不溶于乙醇，丙酮等有机溶剂，在水溶液中带强负电荷，故用水提取后，能用各种阴离子交换树脂吸着，目前国内制备方法多用离子交换树脂分离或在酸性条件下以溴化十五烷吡啶（简写为 PPB）选择性沉淀而获得纯品。

此外，某些水溶性的分子物质如氨基酸、核苷酸及其衍生物，大部份都溶于水，不溶于乙醇、乙醚等有机溶剂，当材料经破碎后，用水或一定 pH 范围的水溶液提取后，滤去残渣即可用离子交换树脂进行分离，最后以乙醇或调整 pH 至等电点沉淀。如需要较纯产品，可通过反复结晶方法而获得。

六、植物次生物质的提取及溶剂系统分离的选择^[51,52]

植物次生物质种类繁多，包括各种生物碱、帖类、苷类、黄酮类和有机酸等，其中大部分在工业上医学上有着广泛用途。如挥发油、蜡、油漆、橡胶、鞣质等都是一些重要工业原料，这些物质的工业提炼方法不属本书讨论范围。但其中某些对人类或动物具有极强生理作用的药物，它们的提取分离纯化方法和其他生化物质的提取分离纯化方法有着许多共同之处。这里主要根据广州医药工业研究所丘晨波经验总结作一简要介绍：

作为药用的植物次生代谢产物，不论干或鲜的材料，粉碎后一般可分为水提取和醇提取二部分。醇提部分，使用最多的溶剂是甲醇，有时也用 60% 或 95% 乙醇代替。如样品中含挥发油较多，并着重研究这些成份，可用石油醚提取。各类药用成份提取选用的溶剂，主要依据被提取物的极性大小而定，欲作系统分离，其溶剂选择可参考表 2-5，由于植物药用成份种类繁多，系统分离时很难一次完成。先粗分后细分，多次完成。如仅研究其某一成份，如生物碱可选择氯仿为主要溶剂进行抽提控制不同 pH，然后加入细分。关于药用植物成份的分离系统，丘晨波提出了如下模式（图 2-7）。

表 2-5 植物药用成份及其适用的提取溶剂

极性大小	植物成份类型	适用提取溶剂	提取溶剂介电常数
亲脂性最强 (极性小)	精油、脂肪油、蜡、叶绿素 甾类、某些甙元	石油醚 乙烷	1.80 1.87
亲脂性强	甾类、甙元、生物碱(游离型)、醛、酮、醇、醌、某些 甙类	乙醚 氯仿	4.3 5.2
中等极性(小) (中)	某些甙类(如强心甙) 某些甙类(如黄酮甙)	氯仿:乙醇(2:1) 乙酸乙酯	— 6.1
	某些甙类(如皂甙、蒽醌甙等)	正丁醇	19
亲水性强	极性大的甙类、糖类和氨基酸等	丙酮 乙醇 甲醇	21 26 31
亲水性最强 (极性大)	蛋白质、粘液质、果胶、 糖类、氨基酸等	水	81

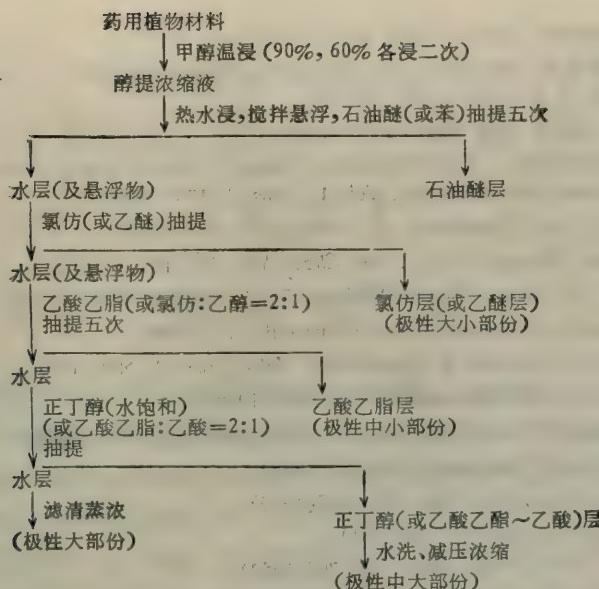


图 2-7 植物成份分离系统简图

参 考 文 献

- [1] West, E. S., 生物物理化学, 中译本, 科学出版社, 78页(1960).
- [2] Hecker, E., *Chimia*, **8**, 229 (1954).
- [3] Gaulor, J. L. and Delwiche, C. V., *Analyt., Biochem.*, **28**, 361 (1969).
- [4] Ito, A. and Sato, R., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4922 (1968).
- [5] 阿南功一等编: 基础生化实验法 [2], 35页, 丸善株式会社 (1975)
- [6] 汪静英、邹承鲁、王应睐: 生理学报, **20**, 84(1956)
- [7] Morton, R. K., *Biochem. J.*, **55**, 786 (1953).
- [8] Penefsky, H. S. and Tzagoloff, A., *Methods in Enzymology*, Vol. 22, 204 (1971).
- [9] Beyer, R. E., *Methods in Enzymology*, Vol. 10, 84 (1966).
- [10] Tzagoloff, A. and Penefsky, H. S., *Methods in Enzymology*, Vol. 22, 219 (1971).
- [11] 程秋琛: 生物化学与生物物理进展, 5期, 76页(1981)
- [12] 尤美莲等: 生物化学与生物物理进展, 6期, 60页(1982)
- [13] 莽克强著: 病毒, 科学出版社 (1982)
- [14] 陈作义, 朱本明: 生物化学与生物物理进展, 4期, 68页(1981)
- [15] 孙册: 生物化学与生物物理进展, 3期, 15页(1981)
- [16] Busch, H., *Methods in Enzymology* Vol. 12, Part B, 65 (1968)
- [17] Freifelder, D., *Methods in Enzymology*, Vol. 12, Part A, 550 (1967).
- [18] Sevag, M. G., Lackman, D. B. and Smolens, J., *J. Biol. Chem.*, **124**, 425 (1938).
- [19] McCarty, M. and Avery, O. T., *J. Expt. Med.*, **83**, 89 (1946).
- [20] Marmur, J., *J. Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961).
- [21] Klett, R. P. and Smith, M., *Methods in Enzymology*, Vol. 12, Part B, 112 (1968).
- [22] Key, E. R. M., Simmons, N. S. and Dounce, A. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1724 (1952).
- [23] Zamenhof, S., *Methods in Enzymology*, Vol. 3, 396 (1957).
- [24] Kirby, K. S., *Biochem. J.*, **64**, 405 (1956).
- [25] Kirby, K. S., *Biochem. J.*, **66**, 495(1957)
- [26] Kirby, K. S., *Biochem. Biophys. Acta*, **55**, 382(1962)
- [27] Kirby, K. S., *Methods in Enzymology*, Vol. 12, Part B, 87 (1968).

- [28] Chen, H. R., *Biochem. Biophys. Acta.*, **240**, 195(1971)
- [29] 周祯林,陈家平,温晋,刘飞鹏,周进,左立人,微生物学报, **22**(3): 257(1982)
- [30] Prunell, A. et al., *J. Mol. Biol.*, **110**, 17(1977)
- [31] Bermardi, G., et al., *J. Mol. Biol.*, **65**, 173(1972)
- [32] 中国科学院微生物研究所编: 核苷酸类物质的生产和应用, 18页,科学出版社 (1971)
- [33] Cox, R. A., *Methods in Enzymology*, Vol. 12, Part B, 120 (1968)
- [34] Reichmann, M. E. and Stace-Smith, R., *Virology*, **9**, 710 (1959)
- [35] Kay, E. R. M. and Dounce, A. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4041 (1953)
- [36] Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. and Williams, R. C., *Biochim. Biophys. Acta.*, **25**, 87(1957)
- [37] Stern, H., *Methods in Enzymology*, Vol. 12, part B, 111 (1968)
- [38] Von Ehrenstein, G., *Methods in Enzymology*, Vol.12, part A, 589 (1967)
- [39] Geoghegan, T. E. et al., *Biochemistry*, **17**, 4200 (1978)
- [40] Mendecki, J., Lee, S. Y. and Brewerman, G., *Biochemistry*, **11**, 792 (1972)
- [41] Brewerman, G. et al., *Biochemistry*, **11**, 637(1972)
- [42] Young, E. T. et al., *J. Mol. Biol.*, **138**, 432(1980)
- [43] Lippincott, J. A., *Virology*, **13**, 348(1961)
- [44] De Carvalho, S., *J. Lab. Clin. Med.*, **55**, 706(1960)
- [45] Cantoni, G. L. and Davies, D. R. (Eds.), *Procedures in Nucleic Acid Research*, New York: Harper and Row (1966)
- [46] Crossman, L. and Moldave, K. (Eds), *Methods in Enzymology*, Vol. 12, Part A (1967) Part B (1968)
- [47] 野島庄七,永林克孝: 脂质, p. 61, 朝倉書店 (1969)
- [48] 阿南功一等编: 基礎生化実験法,[2],335 页,丸善株式会社(1975)
- [49] 阎之素: “植物”杂志,第四期, 18 页(1978)
- [50] Danishefsky, I. et al., *J. Biol. Chem.*, **241**, 143(1966)
- [51] 北京医学院等主编: 中草药成份化学,人民卫生出版社 (1980)
- [52] 丘晨波: “中草药”杂志,第12卷, 10期, 42页(1980)

第三章 沉淀及沉淀剂

苏 拔 贤

第一节 引言

沉淀是溶液中的溶质由液相变成固相析出的过程。在生物化学、有机化学和无机化学制备工艺中，沉淀都是一种最常用的方法。在制备过程中采取沉淀的手段，主要是为了通过沉淀达到浓缩的目的，或者通过沉淀固液分相后，除去留在液相（如果目的物是固相）或沉积在固体中（目的物留在液相）的非必要成份；其次，沉淀可以将已纯化的产品由液态变成固态加以保存或进一步处理。沉淀方法用于分离纯化是有选择性的，即有选择地沉淀杂质或有选择地沉淀所需成份。对于生物活性物质的沉淀，情况更为复杂，不仅在于沉淀作用能否发生，还要注意所用沉淀剂或沉淀的条件对生物活性物质结构是否有破坏作用，沉淀剂是否容易除去；用于食品、医药的沉淀剂还应考虑对人体是否有害等。在生化制备中常有下列几种沉淀方法和沉淀剂：

1. 盐析法。多用于各种蛋白质和酶的分离纯化。
2. 有机溶剂沉淀法。多用于生物小分子、多糖及核酸类产品的分离纯化，有时也用于蛋白质沉淀。
3. 等电点沉淀法。用于氨基酸、蛋白质及其他两性物质的沉淀，但此法单独应用较少，多与其他方法结合使用。
4. 非离子多聚体沉淀法。最近使用于分离生物大分子的例子很多，是发展很快的一种方法。
5. 生成盐复合物沉淀。用于多种化合物，特别是一些小分子物质的沉淀。
6. 热变性及酸碱变性沉淀法。这一类方法也常称为选择性变性沉淀。在分离制备中，常有选择地用于除去某些不耐热及在一定 pH 值下易变性的杂蛋白。但应以在实验条件下所分离物质的活性不受影响为前提。
7. 其他。除以上所述沉淀方法外，只对某一种或某一类物质产生沉淀的沉淀方法及沉淀剂。

下面介绍几种主要沉淀方法的原理，操作及应用实例：

第二节 盐析法

一、基本原理

一般地说，所有固体溶质都可以在溶液中加入中性盐而沉淀析出，这一过程称为“盐析”。在生化制备中，许多物质都可以用盐析法进行沉淀分离，如蛋白质、多肽、多糖、核酸

等。20—40% 饱和度的硫酸铵可以使许多病毒沉淀，使用 43% 饱和度的硫酸铵也可以使 DNA 和 tRNA 沉淀，而 tRNA 保留在上清液中。但盐析法应用最广的还是在蛋白质领域内。用盐析法分离提纯蛋白质已有八十多年的历史，特别是粗提纯阶段，盐析法是一种十分常用的纯化手段。当然在生化制备技术高度发展的今天，盐析法由于共沉作用，不是一个高分辨的方法，但和其他方法交替使用，盐析法仍具有许多突出的优点：

1. 成本低，不需要什么特别昂贵的设备。
2. 操作简单，安全。
3. 对许多生物活性物质具有稳定作用。

关于盐析原理，现以蛋白质为例讨论如下^[1]：

蛋白质在高盐浓度下发生盐析，在低盐浓度下发生盐溶。盐溶现象在第二章中已作过介绍，主要是中性盐离子对蛋白质分子表面极性基团及水活度的影响，增加了蛋白质分子与溶剂分子相互作用力，从而使蛋白质的溶解度增大。但中性盐的浓度渐增至一定程度时，水分子在中性盐的作用下活度大大减少，蛋白质表面电荷大量被中和，最后破坏了蛋白质分子外表的水化膜，使蛋白质分子之间相互聚集而沉淀。蛋白质盐析时与溶液中中性盐的离子强度有如下定量关系：

$$\log \frac{S}{S_0} = -K_s \cdot I \quad (3-1)$$

这里 S 是指在离子强度为 I 时蛋白质的溶解度， S_0 是在纯溶剂（即 $I = 0$ ）时蛋白质的溶解度。 K_s 是一个常数，也称盐析常数。离子强度 I 决定于下式：

$$I = \frac{1}{2} \sum m z^2 \quad (3-2)$$

$\sum m z^2$ 是所有离子总数的电荷，其中 m 为溶液中各种离子的克分子浓度，z 为各种离子的价数，3-1 式中当溶剂的温度为一定时， S_0 对于某一溶质也是一个常数，即

$$\log S_0 = \beta,$$

所以 3-1 式可以改写为：

$$\log S = \beta - K_s \cdot I \quad (3-3)$$

β 值的大小取决于溶质的性质，不可能直接测定，是假定溶解度在 $I = 0$ 时，用外推法求出。故 β 值带有经验性性质。

盐析常数 K_s 值，主要决定于加入盐的性质， K_s 大小与各种离子价数成正比，与离子半径及溶液的介电常数也有关。而离子价数对 K_s 影响比较主要。由于蛋白质表面有很多亲水基团，是一个偶极离子，它需要较高的 I 值才能从溶液中析出，所以蛋白质的 K_s 常数很高，常比一般小分子高出 10—20 倍。 K_s 和蛋白质性质关系不大，但受到溶液的 pH 值和温度的影响。表 3-1 列举了一些蛋白质的盐析常数。

在表中可以看出多价阴离子如硫酸根和磷酸根有很高 K_s ，但高价阳离子如镁（或钙）的存在反而降低 K_s 值。表中还可以看到，蛋白质性质对 K_s 值也有一定影响（虽然不是主要的），如在一种盐浓度中，大而不规则分子如纤维素原， K_s 最大， β -乳球蛋白 K_s 最小，但目前还没有适当理论详细说明溶质的分子性质与 K_s 的关系。

等式 3-3 中的 β 是溶质的特征常数，对于蛋白质来说， β 值大小主要决定于不同蛋白质的性质。

关于蛋白质的盐析条件的研究，四十年代至六十年代已做了大量工作。Czok 和 Bucher，

表 3-1 一些蛋白质的盐析常数^[2]

蛋白 质	NaCl	MgSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	磷酸 盐	柠檬酸 钠
β-乳球蛋白				0.63		
马血红蛋白		0.33	0.71	0.76	1.00	0.69
人血红蛋白					2.00	
马肌红蛋白			0.94			
卵清蛋白			1.22			
纤维蛋白原	1.07		1.46			

Dixon 和 Webb 对利用盐析方法进行蛋白质分离纯化作了系统总结^[3,4], 并在等式 3-3 基础上将盐析方法分为两类:

(1) 在一定的 pH 和温度下改变离子强度(盐浓度)叫 K_s 分段盐析法。

(2) 在一定离子强度下改变 pH 和温度叫“β”分段盐析法。

Czok 和 Bucher 认为第一组适于早期粗抽提液的分步分离, 而第二组则适于后期进一步分离纯化和结晶时使用。Czok 和 Bucher 应用“K_s”分段盐析法曾成功地从肌肉抽提液中分离了多种酶。Jakoby 发现蛋白质在硫酸铵溶液中的溶解度随着温度升高而降低, 从而提出了在 0℃ 用逐步降低浓度的硫酸铵溶液抽提蛋白质沉淀, 然后在室温进行结晶。此法曾成功地分离了许多酶。(详细介绍见本书结晶一章)。

下面, 我们以蛋白质为主要对象讨论应用盐析法的几个问题。

二、影响盐析的若干因素

(一) 蛋白质的浓度与盐析的关系

利用盐析方法分步分离蛋白质各组份和溶液中蛋白质实际浓度有很大关系。例如一种蛋白质在溶液中的浓度为 C₁, 加入中性盐, 浓度直至离子强度等于 I₁ 时, 蛋白质开始沉淀并从溶液中析出。此时等式 3-3 可写作:

$$\text{Log} C_1 = \beta - K_s I_1 \quad (3-4)$$

这里的 I₁ 是蛋白质开始沉淀时的离子强度。但如果这种蛋白质在溶液中含量较低(设其浓度为 C₂), 则需要加入较多的中性盐, 蛋白质才开始沉淀。(设此时离子强度为 I₂) 应写作:

$$\text{Log} C_2 = \beta - K_s I_2 \quad (3-5)$$

3-4 式减 3-5 式得:

$$\text{Log} \frac{C_1}{C_2} = K_s (I_2 - I_1) \quad (3-6)$$

Dixon 和 Webb 用硫酸铵测定碳氧肌红蛋白, (Carboxymyoglobin) 当碳氧肌红蛋白浓度为 30 克/升, 硫酸铵饱和度为 58% 时开始出现沉淀。而羧基肌红蛋白的浓度为 3 克/升, 加至 58% 饱和度硫酸铵不会出现沉淀, 直至到 66% 饱和度时才开始产生沉淀。但在较浓的蛋白质溶液中(30 克/升)当硫酸铵达到 66% 饱和度时已有 90% 蛋白质度沉淀析出。根据上述实验结果, Dixon 等计算出 C₁ = 10C₂ 时, 应增加大约 7% 的硫酸铵饱和度

才可以把低浓度(C_2)的蛋白质沉淀下来。

所以在不同浓度的蛋白质溶液中进行盐析，使用硫酸铵的饱和度范围是不同的。高浓度蛋白质溶液可以节约盐的用量，但许多蛋白质由于“ β ”和“ K_s ”常数十分相近，若蛋白质浓度太高，会发生严重的共沉作用。但在低浓度蛋白质溶液中盐析，所用的盐量较多，而共沉作用比较少，因此需要在二者之间进行适当选择。用于分步分离提纯时，宁可选择稀一些的蛋白质溶液，多加一点中性盐，使共沉作用减至最低限度，当然浓度不能太稀，一般认为2.5%—3.0%的蛋白质浓度比较适中，如果蛋白质浓度太稀，消耗大量的中性盐，对蛋白质的回收也有一定的影响。

(二) 离子强度和离子类型对盐析的影响

上面介绍过，在低离子强度下，许多蛋白质比在纯水中的溶解度大大增加，但当溶液中离子强度不断增加时，各离子之间及离子与溶质分子之间相互竞争水分子，结果导致溶质的溶解度渐渐减少，产生盐析现象。一般来说离子强度越大，蛋白质的溶解度越低。但蛋白质的盐析现象比一般有机分子复杂一些，蛋白质分子大，而且有许多表面电荷，这些

表面所带电荷常随着周围离子和溶剂分子排列秩序的影响而不断变化着，蛋白质分子内还有许多相互作用的基团，这都造成了许多经典理论不能十分完美地解释蛋白质盐析的原因。

几种蛋白质在不同离子强度下的盐析效应见图3-1^[1]，从图中可以看出，当硫酸铵饱和度达到20%时，纤维蛋白原首先析出，饱和度增至28—33%时，血红蛋白析出，饱和度再增至33—35%时，拟球蛋白析出，饱和度至50%以上，清蛋白析出，饱和度最后达到80%时，肌红蛋白析出。可见不同蛋白质

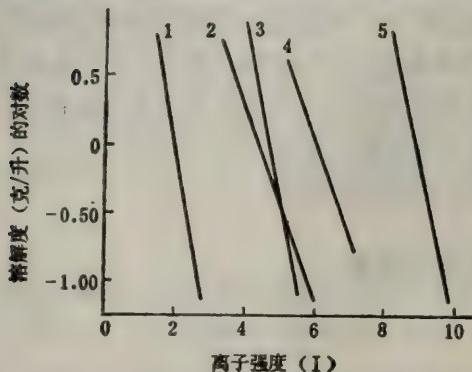


图3-1 几种蛋白质析出时所需硫酸铵的离子强度
1——纤维蛋白原，2——血红蛋白，3——拟球蛋白，
4——血清清蛋白，5——肌红蛋白

发生盐析时所需求的离子强度是不同的。所以用不同离子强度分步盐析的方法，就可以分离混合物中各种组份。在进行分离的时候，一般从低离子强度到高离子强度，顺次进行。每一组份被盐析出来后，经过固-液分离(冰冻离心或过滤)，再在溶液中逐渐提高中性盐的饱和度，使另一种蛋白质组份盐析出来。离子强度的大小对蛋白质的溶解度起着决定性的影响。但在同样的离子强度下，离子种类的不同对蛋白质溶解度的影响也不同。图3-2所示是七种不同电解质下，一氧化碳血红蛋白溶解度曲线^[2]。图中不同离子种类对蛋白质溶解度的影响，可以从Hofmeister系列理论中获得解释：即离子半径小而很高电荷的离子在盐析方面影响较强，离子半径大而低电荷的离子的影响较弱。单价盐如KCl，NaCl的盐析效果一般比较差。图3-3表示不同盐类对同一蛋白质的盐析效应具有不同的“ K_s ”值^[3]， K_s 值可由各种盐的盐析曲线的斜率表示。它们的减少顺序是：磷酸钾>硫酸钠>硫酸铵>柠檬酸钠>硫酸镁。按照Hofmeister系列，镁离子比铵离子小，但实际上硫酸铵的盐析效应比硫酸镁好，主要是镁离子在高离子强度下产生了一层颇大的离子雾，从而减少了它的盐析效应。

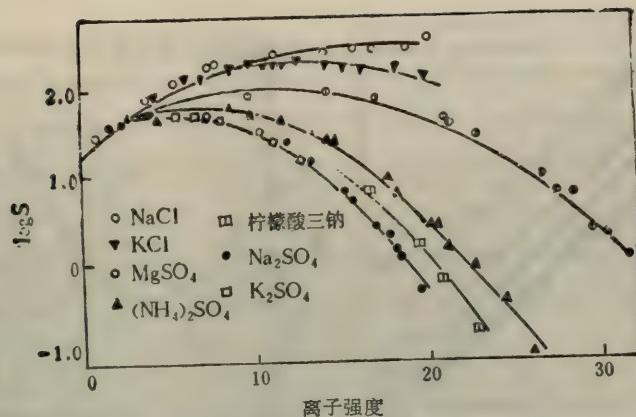


图 3-2 25℃ 一氧化碳血红蛋白在不同电解质下溶解度曲线

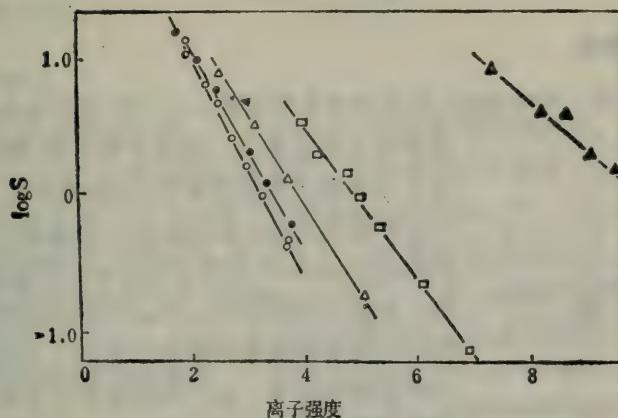


图 3-3 25°C pH 6.6 时一氧化碳血红蛋白在不同电解质中的盐析效应
 ● Na_2SO_4 , □ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ▲ MgSO_4 , △ 柠檬酸三钠, ○ $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$

(三) pH 对盐析的影响

一般地说,蛋白质所带净电荷越多,它的溶解度越大;如果所带的电荷减少至接近于零时溶解度最少,我们称此时的pH值为该蛋白质的等电点(pI)。改变pH或特异地加入与蛋白质极性基团结合的离子(叫反离子)即可改变蛋白质的带电性质,也就是改变了蛋白质的溶解度。图3-4是在不同pH的浓磷酸盐缓冲液下血红蛋白(Haemoglobin)的溶解度曲线^[7]。从图中曲线可见,蛋白质在不同的pH下有着不同的溶解度,远离等电点处蛋白质的溶解度最大,等电点处溶解度最小。因此在盐析时常选择溶液pH值在该蛋白质等电点附近。但必须注意在水中或稀盐溶液中测得的蛋白质等电点与高盐浓度下所测的结果是不同的。需根据实际情况调整pH值至蛋白质溶解度最低处,才能使盐析获得更好效果。

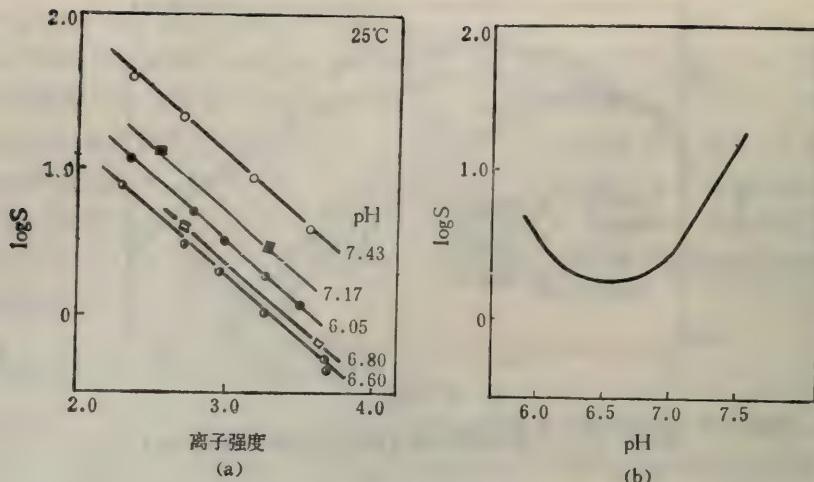


图 3-4 不同 pH 下,在浓磷酸缓冲液中血红蛋白的溶解度曲线
(图 b 是由图 a 所衍生的)

(四) 温度对盐析的影响

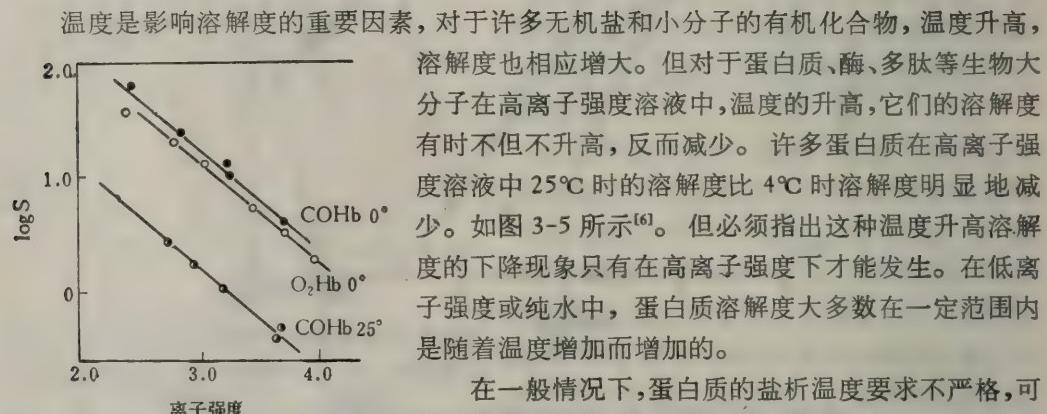


图 3-5 不同温度下,血红蛋白在浓磷酸缓冲液中的溶解度

温度是影响溶解度的重要因素,对于许多无机盐和小分子的有机化合物,温度升高,溶解度也相应增大。但对于蛋白质、酶、多肽等生物大分子在高离子强度溶液中,温度的升高,它们的溶解度有时不但不升高,反而减少。许多蛋白质在高离子强度溶液中 25°C 时的溶解度比 4°C 时溶解度明显地减少。如图 3-5 所示^[6]。但必须指出这种温度升高溶解度的下降现象只有在高离子强度下才能发生。在低离子强度或纯水中,蛋白质溶解度大多数在一定范围内是随着温度增加而增加的。

在一般情况下,蛋白质的盐析温度要求不严格,可以在室温下进行,只有某些对温度比较敏感的酶,要求在低温 0—4°C 下操作,以避免活力的丧失。

三、一般常用的中性盐盐析方法

一般常用的中性盐有硫酸铵、硫酸钠、硫酸镁、磷酸钠、磷酸钾、氯化钠、氯化钾、醋酸钠和硫氰化钾等,其中用于蛋白质盐析的以硫酸铵、硫酸钠最广泛。在表 3-1 中虽然磷酸盐的盐析效果强于硫酸铵,但后者的溶解度比较大(在 0°C 时饱和度为 5.35M,在 25°C 时为 5.82M)而且受温度影响较少。关于不同温度下硫酸铵在饱和水溶液的性质详见表 3-2。

由于有上述的优点在蛋白质盐析时,硫酸铵乃是最受欢迎的盐类。但硫酸铵也有不足的地方,如缓冲能力比较弱,此外,因含有氮原子,对蛋白质的分析会带来一定影响。硫酸钠也较常用于蛋白质的盐析,它的优点是不含氮,不影响蛋白质的定量测定。缺点是在 30°C 以下溶解度太低。在 30°C 以上操作效果较好。磷酸盐、柠檬酸钠、硫氰化钾等有时

表 3-2 不同温度下硫酸铵在饱和水溶液的性质^[7]

性 质	温 度 度 (°C)				
	0	10	20	25	30
摩尔/1000 克水	5.35	5.53	5.73	5.82	5.91
克/1000 克水	706.96	730.73	757.16	769.05	780.95
重 量 %	41.42	42.22	43.09	43.47	43.85
比 重	1.2428	1.2436	1.2447	1.2449	1.2450
克/1000 毫升溶液	514.72	535.05	536.34	541.24	545.88
摩尔/1000 毫升溶液	3.90	3.97	4.06	4.10	4.13
克/1000 毫升水	706.86	730.53	755.82	766.80	777.55

也用于蛋白质的盐析。但由于溶解度低，易与其它金属产生沉淀，或因酸性过强，都不如硫酸铵应用那样广泛。

(一) 硫酸铵盐析法

1. 硫酸铵使用前的预处理 一般生化工业制备用的硫酸铵。选择三级纯度即可，但对于实验定沉淀蛋白质或酶用的硫酸铵，常需要纯度较高或进行重结晶后才能使用。硫酸铵中含有少量重金属离子对蛋白质的巯基十分敏感，使用时必须用 H_2S 进行处理。处理方法是先将硫酸铵配成浓溶液，然后通入 H_2S 至饱和，放置过夜，用滤纸过滤除去重金属离子后，滤液在瓷蒸发皿中浓缩结晶，在 100°C 下烘干后即可使用^[8]，另高浓度的硫酸铵溶液一般呈酸性 (pH 5.0 左右)，使用前也需要用氨水或硫酸调至所需 pH 值。

2. 硫酸铵的饱和度及调整法 盐析时硫酸铵的浓度常用饱和度表示，达到饱和状态时的硫酸铵饱和度 (P) 为 100%。当盐析要求不同的硫酸铵饱和度时可用下面三种方法调整：

(1) 加入固体盐法：这当盐析要求饱和度较高而又不增大溶液的体积时，多用此法。操作时先将硫酸铵磨碎成均匀细粒，在搅拌下缓慢分批加入。各种不同的饱和度应加入硫酸铵的量可以从表 3-3, 3-4 中查得。

(2) 加入饱和溶液法：饱和硫酸铵的配制，一般方法是取过量硫酸铵加热溶解，再在 0°C 或室温放置，直至固体硫酸铵析出为度。

实例：取 800—850 克化学纯度的硫酸铵加入蒸馏水至总体积为 1 升，加热至 50°C，保温 10 分钟，待大部分固体溶解后，趁热滤去不溶物，放置过夜，第二天如有少量硫酸铵晶体析出，即达 100% 的饱和度。

盐析时要求的饱和度所需加入饱和硫酸铵溶液的体积计算如下式：

$$V = V_0(S_2 - S_1)/(1 - S_2)$$

V = 是所需加入饱和硫酸铵溶液的体积。

V_0 = 原来待盐析溶液的体积。

S_1 = 原来溶液的硫酸铵饱和度。

S_2 = 所需达到的硫酸铵的饱和度。

加入饱和溶液法适于要求硫酸铵饱和度不高，而且原来溶液体积不大时使用。二种不同浓度的硫酸铵溶液混合时，体积的变化的计算误差在2%左右，在一般实验工作及工业生产上影响是不大的。但如加入饱和溶液后体积增加甚大，选用固体加入法较好。饱和硫酸铵溶液加入法，操作时也需注意少量分批在搅拌下缓慢地倾入。以免造成局部过浓，影响分离的效果。

表 3-3 室温 25°C 硫酸铵水溶液由原来的饱和度达到所需要的饱和度时，
每升硫酸铵水溶液应加入固体硫酸铵的克数^[9]

		需要达到的硫酸铵的饱和度 (%)																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
硫酸铵原来的饱和度 (%)	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	496
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	50										33	66	101	137	176	214	302	392
	55										33	67	103	141	179	264	353	
	60											34	69	105	143	227	314	
	65												34	70	107	190	275	
	70													35	72	153	237	
	75														36	115	198	
	80															77	157	
	90																79	

在 25°C 下，硫酸铵溶液由初浓度调到终浓度时，每升溶液所加固体硫酸铵的克数

(3) 透析平衡法：先将待盐析的样品装于透析袋内，然后浸入饱和硫酸铵溶液中进行透析，外部的硫酸铵由于扩散作用不断通过半透膜进入透析袋内，逐步达到所需要的盐析饱和度，蛋白质便产生沉淀，此时即停止透析。透析法的优点是硫酸铵浓度变化有连续性，盐析效果较好，但透析法计算饱和度的测定工作手续烦琐。除了结晶时多使用外，一般盐析沉淀比较少用。

3. 使用硫酸铵进行盐析必需注意的几个问题

(1) 加固体硫酸铵时，必须看清楚表上所规定的温度，一般有 0°C 或室温(20°—25°C)两种，加入固体盐后体积的变化已考虑在表中。例如在室温时 $S_1=0$ ，要求达到 S_2 为 100% 饱和度，每升溶液加固体硫酸铵为 767 克。欲使 S_2 为 50% 饱和度时应加 313 克而不是 $767/2=383.5$ 克。

表 3-4 0°C 下由 S₁ 提高到 S₂ 时每 100 毫升加固体硫酸铵的克数

溶 液 的 原 始 饱 和 度 (%)	饱和度	在 0°C 时所达到的硫酸铵饱和度(%)																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
		在 100 毫升中欲加固体硫酸铵的克数																
0	0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25	25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30	30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.2	36.2	40.2	44.5	48.8
35	35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
40	40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
45	45						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
50	50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8
55	55								0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3
60	60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.1	27.9
65	65										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
70	70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
75	75												0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
80	80													0	3.3	6.7	10.3	13.9
85	85														0	3.4	6.8	10.5
90	90															0	3.4	7.0
95	95															0	3.5	
100	100																0	

(2) 分段盐析时, 要考虑到每次分段后蛋白质浓度的变化, 蛋白质浓度的不同要求盐析的饱和度也不同。一种蛋白质如经二次盐析, 第一次盐析分离范围比较宽, 第二次分离范围较窄。如胆碱酯酶第一次硫酸铵盐析的饱和度范围为 35% 至 60%, 第二次为 40% 至 60%。脱氧核糖核酸酶第一次硫酸铵盐析的饱和度范围为 20% 至 40%, 第二次则为 30% 至 40%。

(3) 为了获得实验的重复性, 盐析的条件如 pH 值温度和硫酸铵的纯度都必须严加控制。

盐析后一般需放置半小时至 1 小时, 待沉淀完全后才过滤离心, 过早的分离将影响收率, 低浓度的硫酸铵溶液盐析后固液分离常采用离心方法, 高浓度硫酸铵溶液则常用过滤方法。因高浓度硫酸铵的密度太大, 蛋白质要在悬浮液中沉降出来, 需要较高离心速度和长时间的离心操作, 故采取过滤法较合适。

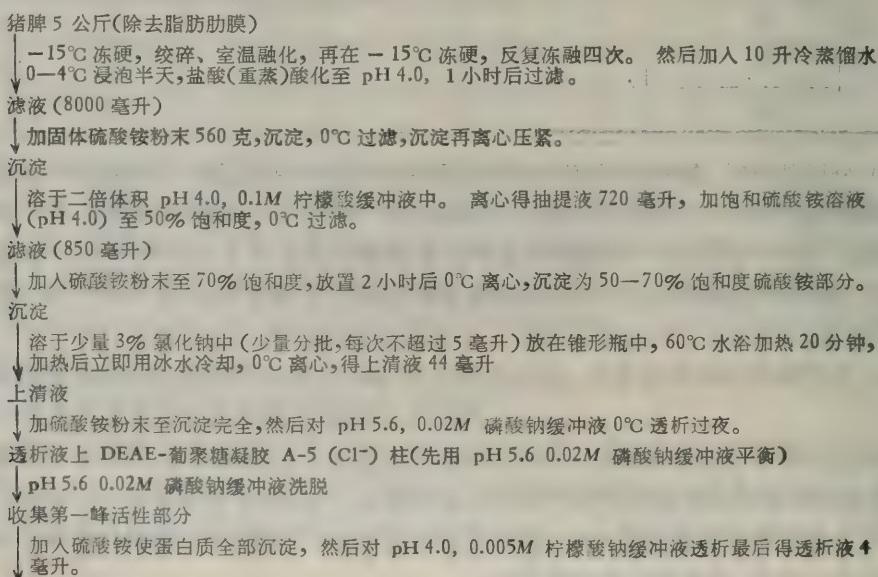
4. 硫酸铵盐析的实例

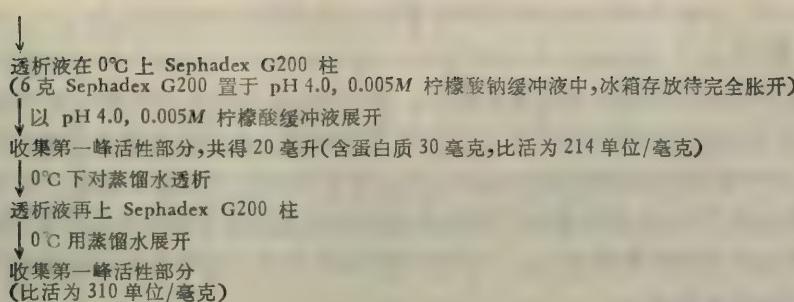
例(1) 血清中各主要蛋白质组份的盐析分离^[1]



** PBS 为磷酸缓冲液, 0.2M, pH 7.2 并加入氯化钠至 0.15M。

例(2) 高活性组织蛋白酶 C (二肽酰氨基肽酶) 的分段盐析制备^[2]





(二) 硫酸钠盐析法

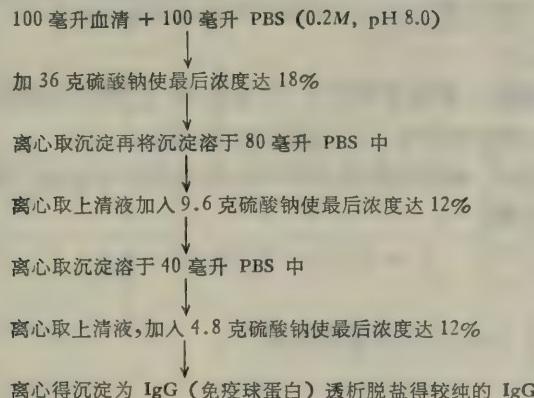
在很早以前已有人用硫酸钠来分离血清中的蛋白质, 但由于其盐析效果不如硫酸铵, 因而应用范围也不及硫酸铵盐析广泛。其操作方法如硫酸铵盐析一样, 这里不另赘述。硫酸钠在不同温度下的溶解度见表 3-5。

表 3-5 不同温度下硫酸钠的溶解度^[10]

温度(°C)	0	10	20	25	30	32
溶解度(克/升)	13.8	18.4	24.8	28.2	32.6	34.0

硫酸钠应用于蛋白质分段盐析举例如下:

例: 使用硫酸钠提取较纯 IgG (免疫球蛋白)^[11]



(三) 其它中性盐应用于蛋白质的盐析

例如: 用低浓度氯化钠沉淀 DNA 核蛋白质, 用低浓度硫氰化钾沉淀人脐干扰素等^[11]。但没有硫酸铵应用那样广泛。

第三节 有机溶剂沉淀法

一、基本原理

有机溶剂对许多能溶于水的小分子生化物质以及核酸、多糖、蛋白质等生物大分子都

能发生沉淀作用。有机溶剂的沉淀作用主要是降低水溶液的介电常数，如20℃时水的介电常数为80，而82%乙醇溶液的介电常数为40。溶液的介电常数减少就意味着溶质分子异性电荷库仑引力的增加从而使溶解度减少。这一点可以从静电学的库仑定律中得到阐明。在库仑定律的公式中带电离子基团之间作用力随着介电常数的减少而增大，离子之间不断接近，两带电基团的距离也随之减少，因此带电溶质便互相吸引凝聚。对于具有表面水层的生物大分子来说，有机溶剂与水的作用不断使这些分子表面水层厚度压缩，最后使这些大分子脱水而相互聚集析出。不同溶质的沉淀要求不同浓度的有机溶剂，是有机溶剂分步沉淀的理论基础。

有机溶剂沉淀法的优点是：(1)分辨能力比盐析法高，即一种蛋白质或其他溶质只在一个比较窄的有机溶剂浓度范围内沉淀。(2)沉淀不用脱盐，过滤比较容易。(3)在生化制备中应用比盐析法广泛。其缺点是对某些具有生物活性的大分子，如酶，容易引起变性失活，操作常需在低温下进行。

二、有机溶剂的选择及浓度计算

用于生化制备沉淀的有机溶剂的选择首先是能和水混溶。使用较多的有机溶剂是乙醇、甲醇、丙酮。还有二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、乙腈和2-甲基-2,4-戊二醇(MPD)等。作为核酸、糖类、氨基酸和核苷酸等物质的沉淀剂最常用的是乙醇，对于蛋白质和酶的沉淀，乙醇、甲醇和丙酮都可以使用，但甲醇和丙酮对人体有一定毒性。总的来说蛋白质的有机溶剂沉淀法不如盐析法普遍。核酸的有机溶剂沉淀，除了乙醇外，异丙醇和 α -二氧基乙醇也常被采用。

其他一些有机溶剂如二甲酰甲酰胺、二甲基亚砜、乙腈以及氯仿、乙醚等，作为沉淀剂其应用的对象及条件，则必须根据具体情况而选择。

进行有机溶剂沉淀时，欲使原溶液达到一定的有机溶剂浓度，需加入的有机溶剂的浓度及体积可按下公式计算：

$$V = V_0(S_2 - S_1)/(100 - S_2)$$

式中：

V — 需加入100%浓度有机溶剂的体积。

V_0 — 原溶液体积。

S_1 — 原溶液中有机溶剂的浓度。

S_2 — 所要求达到有机溶剂的浓度。

一种组份的浓度		需要混合的量
原来浓度	要求的浓度	
96%	80%	80 - 75 = 5份
75%	80%	96 - 80 = 16份

一种组份的浓度		需要混合的量
原来浓度	要求的浓度	
96%	40%	40 - 0 = 40份
纯溶剂	40%	96 - 40 = 56份
0%	40%	

图3-6 一种组份溶剂的比例图解计算法

表 3-6 制备较低浓度乙醇 1 升所需较高浓度乙醇及水的用量表(毫升, 20°C)

测得混合液的浓度 % (V/V)			95	90	85	80	75	70	65	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
较 高 浓 度 乙 醇 的 浓 度 (V/ V) %	100	醇 水	950 62	900 119	850 174	800 228	750 282	700 334	650 385	600 436	550 487	500 537	450 585	400 633	350 681	300 727	250 772	200 817	150 862	100 908	50 953
		醇 水	947 61	895 119	842 176	789 233	737 288	684 344	632 397	579 451	526 504	474 556	421 608	368 658	316 708	263 756	211 805	158 852	105 901	53 950	
	90	醇 水	994 62	889 122	833 182	778 241	722 299	667 357	611 414	556 471	500 526	444 580	389 635	333 687	278 739	222 791	167 842	111 894	56 947		
		醇 水	941 65	882 128	824 190	765 252	706 313	647 374	588 434	529 493	471 552	412 609	353 665	294 721	235 776	176 832	118 887	59 943			
	85	醇 水	938 67	875 134	813 200	750 265	688 330	625 394	563 457	500 520	438 581	375 641	313 701	250 760	188 819	125 879	63 939				
		醇 水	933 71	867 141	800 211	733 280	667 349	600 417	533 483	467 550	400 614	333 678	267 742	200 806	133 870	76 929					
	75	醇 水	929 76	857 150	786 225	714 298	643 371	571 443	500 514	429 584	357 653	286 722	214 790	143 860	77 929						
		醇 水	923 81	846 160	769 240	692 319	615 396	538 473	462 548	385 624	308 698	231 773	154 848	77 923							
	70	醇 水	917 87	833 173	750 258	667 343	583 426	500 509	417 591	333 672	250 753	167 835	83 917								
		醇 水	909 94	817 187	727 279	636 370	545 461	455 551	364 640	273 730	182 819	91 909									
	65	醇 水	900 103	800 204	700 305	600 405	500 504	400 603	300 701	200 800	100 900										
		醇 水	889 113	778 225	667 336	556 447	444 557	333 667	222 778	111 889											
	60	醇 水	875 126	750 252	625 376	500 500	375 625	250 750	125 875												
		醇 水	857 144	714 286	571 429	429 571	286 571	143 714	857 857												
	55	醇 水	833 167	667 333	500 500	333 667	222 333	111 333	555 833												
		醇 水	800 103	700 204	600 305	500 405	400 504	300 603	200 701	100 800											
	50	醇 水	785 94	687 187	588 279	488 370	400 461	300 551	200 640	100 730	50 819										
		醇 水	750 94	667 187	567 279	467 370	385 461	286 551	187 640	100 730	50 909										
	45	醇 水	725 94	633 187	533 279	433 370	355 461	250 551	155 640	75 730	45 819										
		醇 水	700 94	600 187	500 279	400 370	325 461	225 551	125 640	70 730	40 909										
	40	醇 水	675 126	575 252	500 376	400 500	300 625	200 750	125 875												
		醇 水	650 144	550 286	450 429	350 571	250 714	125 857													
	35	醇 水	625 144	525 286	425 429	325 571	225 714	125 857													
		醇 水	600 144	480 286	380 429	280 571	180 714	100 857													
	30	醇 水	575 167	467 333	367 333	267 300	167 300	83 200	50 333	33 167											
		醇 水	550 167	440 333	340 300	240 267	140 200	75 167	40 333	20 667											
	25	醇 水	525 200	417 300	317 240	217 267	117 167	50 100	25 50	10 833											
		醇 水	500 200	390 240	290 267	190 167	90 50	40 25	20 50	10 250											
	20	醇 水	475 250	367 250	267 200	167 140	67 50	33 20	17 10	8 500											
		醇 水	450 250	340 250	240 200	140 100	60 40	30 20	15 10	8 500											
	15	醇 水	425 667	317 333	217 240	117 144	50 67	25 33	12 17	6 667											
		醇 水	400 667	290 333	190 240	90 144	40 67	20 33	10 17	5 667											
	10	醇 水	375 500	267 500	167 400	67 200	25 100	12 50	6 25	3 500											
		醇 水	350 500	240 500	140 400	60 200	20 100	10 50	5 25	2 500											

100 指加入的有机溶剂浓度为 100%，如所加入的有机溶剂的浓度为 95%，上式 $(100-S_2)$ 项应改为 $(95-S_2)$ 。

上式的计算由于未考虑混溶后体积的变化和溶剂的挥发情况，实际上存在一定的误差。如有机溶剂浓度不要求太精确时，可用简单的图解方法求出^[12]（见图 3-6）。有时为了获得沉淀而不是进行分离，可用溶液体积倍数如一倍、二倍、三倍等来表示。

表 3-6 是制备不同浓度乙醇溶液所需较高浓度乙醇及水的用量表^[13]。

三、有机溶剂沉淀的影响因素及注意事项

（一）温度

多数蛋白质在乙醇—水混合液中的溶解度随着温度的降低而降低，对于其他物质也

大致如此。值得注意的是大多数生物分子如蛋白质、酶和核酸在有机溶剂中对温度反应特别敏感，温度稍高即发生变性。因此，加入的有机溶剂都必须预冷至较低温度，操作要在冰浴中进行，同时加入有机溶剂必须缓慢而且不断搅拌以免溶剂局部过浓。一种低温下使用有机溶剂沉淀装置如图 3-7 所示^[14]。有机溶剂沉淀一些小分子物质（如核苷酸、氨基酸、生物碱及糖类等），其温度要求没有生物大分子那样苛刻。这是因为小分子物质结构比较稳定，不易破坏。但低温对于提高沉淀效果仍是有利的。

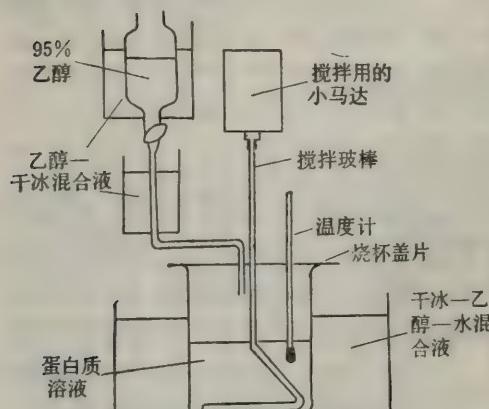


图 3-7 低温有机溶剂沉淀装置

（二）样品浓度

样品浓度对有机溶剂的影响与盐析情况相似，低浓度样品使用有机溶剂的量大但共沉作用小，利于提高分离的效果；但低浓度样品损失较大（即回收率小），具有生理活性的样品易产生稀释变性。反之高浓度样品可以节省有机溶剂，减少变性危险，但共沉作用大，分离效果较差。一般认为蛋白质最初浓度为 5—20 毫克/毫升，粘多糖 1—2% 范围较为合适，再加上选择适当的 pH 值，进行分段沉淀，即可获得较好的结果。

（三）pH 值

在样品结构稳定范围下选择溶解度最低处的 pH 值，有利于提高沉淀效果。另外，适宜的 pH 值也可大大提高分离的分辨能力。例如上海生化制药厂用乙醇分段沉淀糖蛋白绒膜激素（HCG）时，蛋白质浓度为 1%，乙醇浓度为 55%，一部分 HCG 产生沉淀，但不完全。加入一定醋酸铵后，乙醇浓度增至 66%，但没有产生沉淀，再结合调整 pH 至 5.7 附近，HCG 则在非常狭窄的乙醇浓度下沉淀下来。

（四）金属离子的影响

一些多价阳离子如 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 在一定 pH 值下能与呈阴离子状态的蛋白质形成

复合物，这种复合物在水中或有机溶剂中的溶解度都大大降低，而不影响蛋白质的生物活性。如使用 $0.005M$ 至 $0.02M$ 的 Zn^{2+} 可以使原来沉淀蛋白质的有机溶剂用量减少 $\frac{1}{3}$ 至 $\frac{1}{2}$ ，这在工业上很有实用价值。但使用此一方法时，需事先加有机溶剂除去杂蛋白，同时在沉淀后尽可能避免这些离子残存于蛋白质中。如使用 Zn^{2+} 时，蛋白质溶液中则不能含有磷酸盐，以免产生磷酸锌沉淀不易与蛋白质分开。

钙与锌离子的存在，也可提高粘多糖乙醇分步沉淀的效果，二价钡离子也有同样作用。

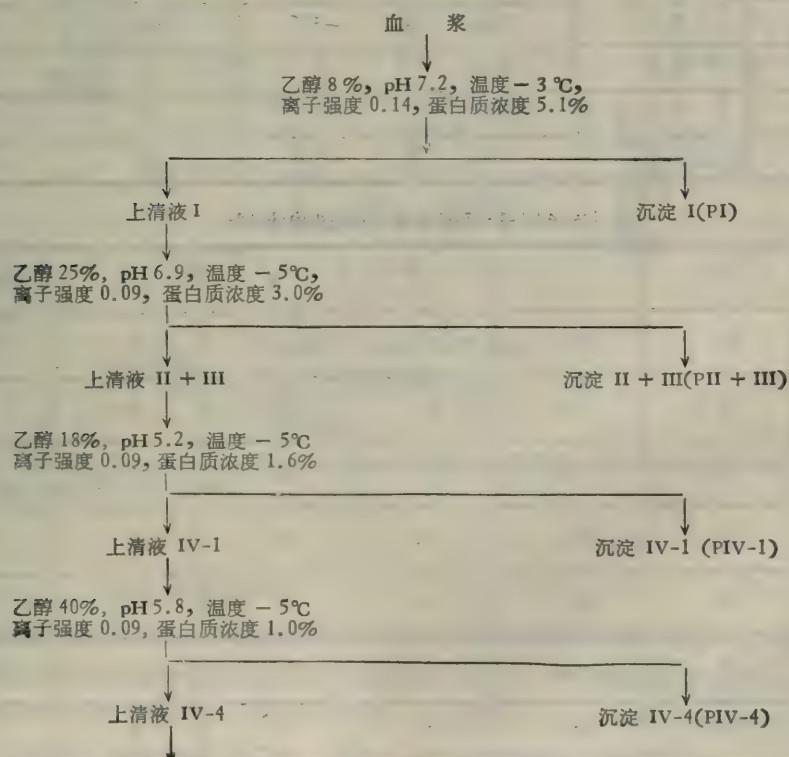
(五) 离子强度的影响

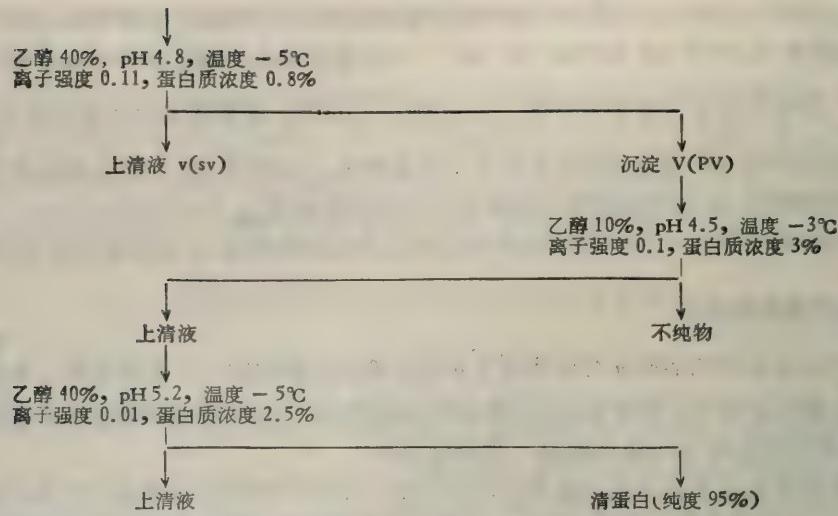
离子强度是影响溶质在有机溶剂及水混合液中溶解度的一个重要因素，盐的浓度太小或太大都对分离有不利影响，对于蛋白质和多糖，在有机溶剂中盐的浓度不超过 5% 比较合适，使用的乙醇量也以不超过二倍体积为宜。

有机溶剂沉淀所应用的对象是比较广泛的。许多种类的生化物质，只有选用合适的有机溶剂，注意调整样品浓度、温度、pH 值和离子强度，使这些因子综合地发挥作用，都可以获得较好的实验结果。有机溶剂沉淀所得的固态样品，如果不是立即溶解进行第二步分离，则应尽可能抽干，减少沉淀中有机溶剂的含量，以免影响样品的生物活性。

四、有机溶剂沉淀法实例

例(一)：血浆—乙醇分步沉淀法^[15] [Cohn 方法 6]





附: [方法6]乙醇分步沉淀有关条件及组份的分析

1. [方法6]分离的条件及各阶段蛋白质浓度的测定

条件	pH	离子强度	温度 [°C]	乙醇浓度 [%]	蛋白质浓度 [克/100毫升]
原血浆	7.4	0.16			6.03
PI	7.2	0.16	-3	8	5.11
PII + III	6.8	0.09	-5	25	3.00
PIV-1	5.2	0.09	-5	18	1.58
PIV-4	5.8	0.09	-5	40	1.01
PV	4.8	0.11	-5	40	0.75
SV	4.8	0.11	-5	40	0.2

2. [方法6]各分离阶段蛋白质组份电泳分析

	Alb	α	β	ϕ	γ	收量[%]
原血浆	56	13	16	3.8	11	100
PI	5.8	8.8	15	62	8.3	5.2
PII + III	4.5	5.8	48	53	37	29
PIV-1	0	88	9.8	0	2	7.7
PIV-4	15	47	38	0	0	8.8
PV	95	4.1	0.9	0	0	48
SV	40	20	40	0	0	1.5

3. [方法 6] 各分离阶段分离条件图解 (图 3-8)

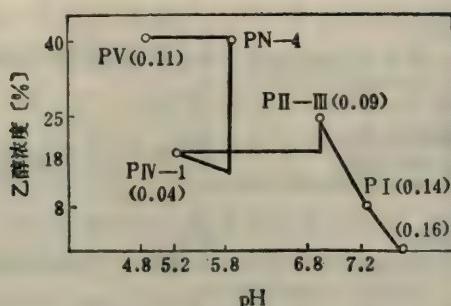
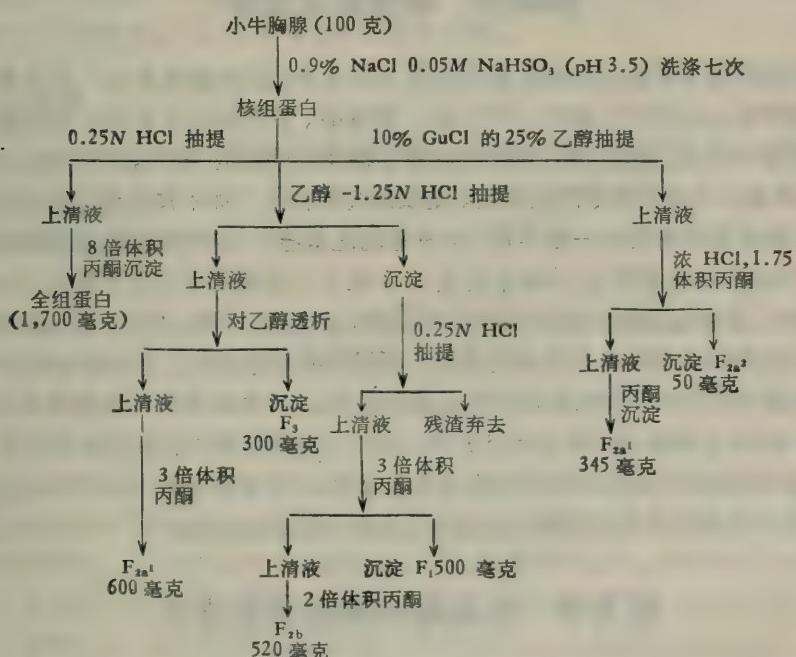


图 3-8 各分离阶段分离条件图解

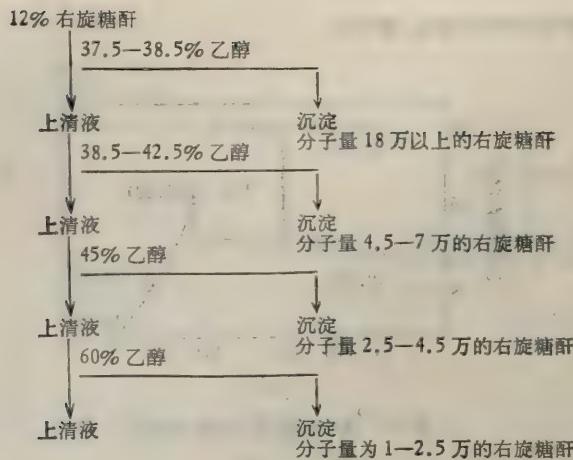
例 (二) 小牛胸腺核组蛋白, 全组蛋白和组蛋白各组份的分离^[16]



注: F₁、F_{2a1}、F_{2a2}、F_{2b} 和 F₅ 为 Johns 和 Butler 对组蛋白的分类系统 [见 Prog. Biophys. Mol. Biol., 18, 209 (1968)]

例 (三) 多糖类的分离^[13,17]

多糖类的水溶液加入等量或倍量的乙醇 (或用丙酮和甲醇代替), 可以破坏多糖颗粒的水化膜及降低溶液的电解常数, 使多糖沉淀而析出。含有糖醛酸或硫酸基团的多糖, 可以在其盐类溶液中直接加入乙醇, 则多糖以盐的形式沉淀。如在其醋酸或盐酸溶液中加入乙醇, 则多糖以游离酸形式沉淀。乙醇分步沉淀右旋糖酐例子如下:



第四节 等电点沉淀法

等电点沉淀法主要利用两性电解质分子上的电中性时溶解度最低，而各种两性电解质具有不同等电点而进行分离的一种方法。氨基酸、核苷酸和许多同时具有酸性及碱性基团的生物小分子，以及蛋白质、酶、核酸等生物大分子都是一些两性电介质。在处于等电点时的 pH 值，再加上其他沉淀因素，则很易沉淀析出。如不加其他沉淀因素，带有水膜的大分子如蛋白质等仍有一定溶解度，不易沉淀析出。另许多蛋白质的等电点十分接近，单独使用此法效果不理想，分辨率也差。一般用于提取液中除去杂蛋白，如在工业上生产胰岛素时，在粗提取液中先调 pH 8.0 去碱性蛋白，再调 pH 3.0 去酸性蛋白（以上均常加入一定有机溶剂以提高沉淀效果）。利用等电点除杂蛋白方法须事先了解所制备的物质对酸碱的稳定性，不然，盲目使用是很危险的。不少蛋白质与金属离子结合后，等电点会发生偏移，如胰岛素等电点为 5.3，与 Zn^{2+} 结合后，形成胰岛素锌盐，其等电点度为 6.2，故加入金属离子后选择等电点沉淀时，必须注意调整 pH 值。等电点法常和盐析法、有机溶剂法或和其他沉淀剂一起使用，以提高其沉淀能力。

第五节 生成盐类复合物沉淀法

生物大分子和小分子都可以生成盐类复合物沉淀，此法一般可以分为（1）与酸性功能团作用的金属复合盐法（如铜盐、银盐、锌盐、铅盐、锂盐、钙盐等），（2）与碱性功能团作用的有机复合盐法（如苦味酸盐、苦酮酸盐、丹宁酸盐等），（3）无机复合盐法（如磷钨酸盐、磷钼酸盐等）。以上盐类复合物都具有很低的溶解度，极容易沉淀析出，若沉淀为金属复合盐，可通过 H_2S 使金属变成硫化物而除去，若为有机盐酸盐、磷钨酸盐，则加入无机酸并用乙醚萃取，把有机酸、磷钨酸等移入乙醚中除去；或用离子交换法除去。但值得注意的是，重金属、某些有机酸与无机酸和蛋白质形成复合盐后，常使蛋白质发生不可逆的沉淀，应用时必须谨慎。

(一) 金属复合盐法

许多有机物包括蛋白质在内，在碱性溶液中带负电荷，都能与金属离子形成沉淀。所用的金属离子，根据它们与有机物作用的机制可分为三大类。第一类包括 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} ，它们主要作用于羧酸、胺及杂环等含氮化合物。第二类包括 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Pb^{2+} ，这些金属离子也能和羧酸起作用，但对含氮物质的配基没有亲和力。第三类金属包括 Hg^{2+} 、 Ag^+ 和 Pb^{2+} ，这类金属离子对含硫氨基的化合物具有特殊亲和力。蛋白质和酶分子中含有羧基、氨基、咪唑基和硫氨基等，均可以和上述金属离子作用形成盐复合物。但复合物的形式和种类则依照各类金属离子和蛋白质的性质，溶液离子强度和配基的位置等而有所不同。关于蛋白质—金属复合物形成的机理，Gurd 和 Wilcox 等曾作过全面论述^[18]，读者有兴趣时，可进一步查阅。

蛋白质—金属复合物的重要性质是它们的溶解度对介质的介电常数非常敏感，调整水溶液的介电常数(如加入有机溶剂)，用 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 等金属离子可以把许多蛋白质沉淀下来，而所用金属离子浓度约为 0.02M 左右即可。金属离子复合物沉淀也适用于核酸或其他小分子，例如 0.01N 的 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 在室温下可以完全沉淀 PolyA 和 PolyI。金属离子沉淀氨基酸，多肽及有机酸等。详见实例。

(二) 有机盐法

含氮有机酸如苦味酸、苦酮酸、鞣酸等都能与有机分子的碱性功能团形成复合物而沉淀析出。但这些有机酸与蛋白质形成盐复合物沉淀时，常常发生不可逆的沉淀反应，工业上应用此法制备蛋白质时，需采取较温和的条件，有时还加入一定的稳定剂，以防止蛋白质变性。

近年来应用一种吖啶染料雷凡诺(2-乙氧基-6,9-二氨基吖啶乳酸盐，2-ethoxy-6,9-diaminoacidine lactate)，虽然其沉淀机理比一般有机酸盐复杂，但其与蛋白质作用也主要是通过形成盐的复合物而沉淀的。此种染料据报导时提纯血浆中 γ -球蛋白有较好效果^[19]。实际应用时以 0.4% 的雷凡诺溶液加到血浆中，调 pH 7.6—7.8，除 γ -球蛋白外，可将血浆中其他蛋白质沉淀下来。然后以 5% 浓度 NaCl 将雷凡诺沉淀(或通过活性炭柱或马铃薯淀粉柱吸附除去)。溶液中的 γ -球蛋白可用 25% 乙醇或加等体积饱和硫酸铵溶液沉淀回收。使用雷凡诺沉淀蛋白质，不影响蛋白质活性，并可通过调整 pH 值，分段沉淀一系列蛋白质组份。但蛋白质的等电点在 pH 3.5 以下或 pH 9.0 以上，不被雷凡诺沉淀。核酸大分子也可在较低 pH 值时(pH 2.4 左右)，被雷凡诺沉淀。

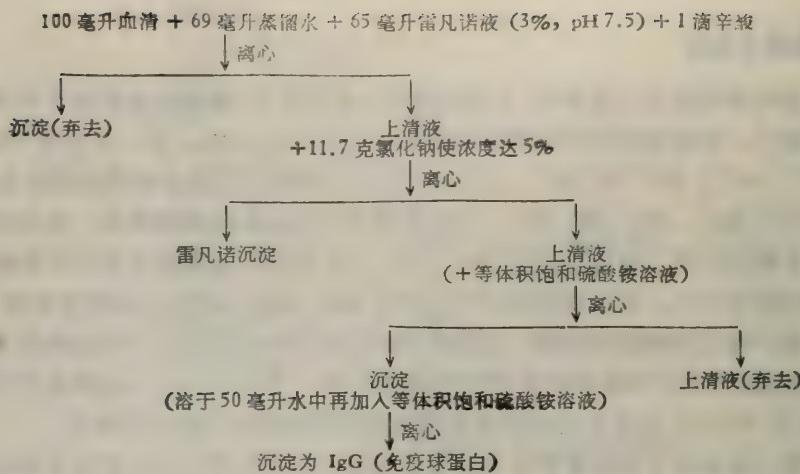
(三) 无机盐法

一般用于小分子如氨基酸的分离制备，大分子蛋白质、酶和核酸则很少使用。

(四) 实例

关于各类生化物质盐类复合物沉淀法举例如下：

实例一 雷凡诺提取免疫球蛋白^[11]



实例二 糜酸沉淀法制备菠萝蛋白酶*

25 公斤菠萝下脚料, 经压榨, 10% NaCl 抽提二次, 共得清液 12 升, 用柠檬酸调 pH 4.5*

↓
加入 0.06% 二氧化硫, 0.02% 抗坏血酸作稳定剂
↓
在搅拌下缓慢加入 0.5% 糜酸至沉淀完全。
↓ 离心
沉淀用 pH 4.5, 0.02% 抗坏血酸溶液洗涤数次, 除去沉淀中的糜酸(每次洗涤后离心)
↓
沉淀干燥后得菠萝蛋白酶成品

* 选自广西南宁罐头厂生产工艺

实例三 铜盐沉淀法制备谷胱甘肽

100 公斤面包酵母, 轧碎后加入硫酸, 乙醇-乙醚混合液 10,000 毫升*
降温 30°C 以下, 搅拌抽提 30 分钟。

↓ 抽滤
滤液以浓硫酸调节到 0.5 当量酸度
↓
约得 8 升滤液在 40°C 保温中, 边搅拌, 边加入约 4 克氧化亚铜, 静置 20 分钟。
↓ 过滤
沉淀用 0.5N H₂SO₄ 洗涤, 再加蒸馏水洗涤数次, 直到滤出液与氯化钡不产生白色沉淀。
↓
刮下无硫酸根的谷胱甘肽铜盐, 加入 2—3 倍体积的水, 使溶解。
↓
通入 H₂S 三小时, 抽滤, 得饱和的硫化氢谷胱甘肽滤液。
↓
通入氮气, 除净滤液中的 H₂S
↓ 布氏漏斗抽滤
滤液加入 10 倍左右的丙酮, 冷库放置 1—2 天
↓
沉淀物用两倍冷丙酮洗几次, 干燥后得谷胱甘肽产品约 100 克。

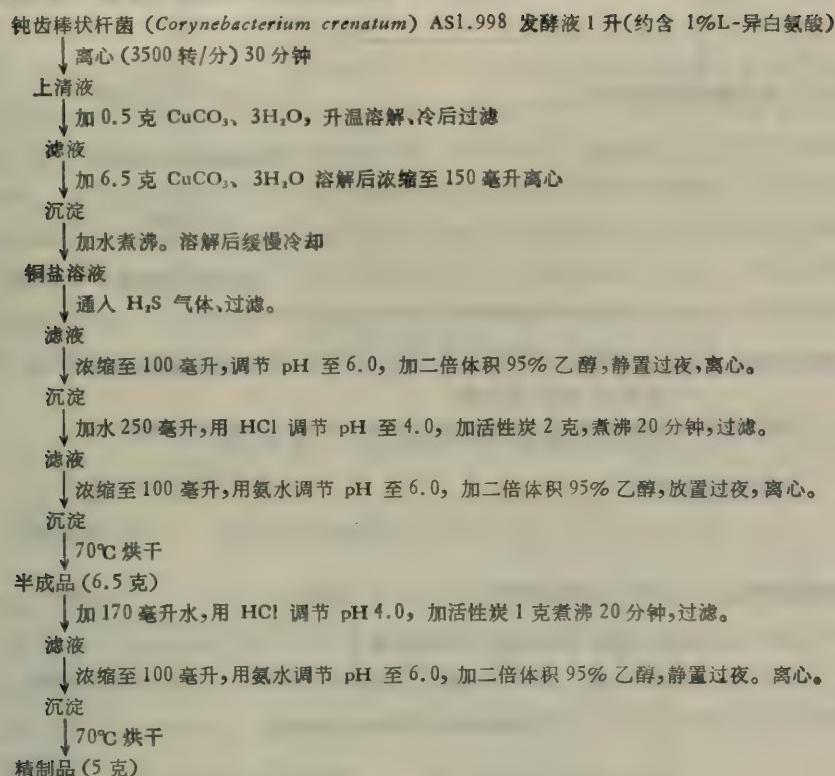
* 硫酸, 乙醇-乙醚混合液的配制: 在耐酸缸中加入 86% 乙醇 5000 毫升(在冰浴中), 逐渐加入浓硫酸 1000 毫升(使温度不超过 30°C), 硫酸加完后, 待液温降至 10°C 以下时, 加入乙醚 4000 毫升。

引自上海酵母厂的生产工艺

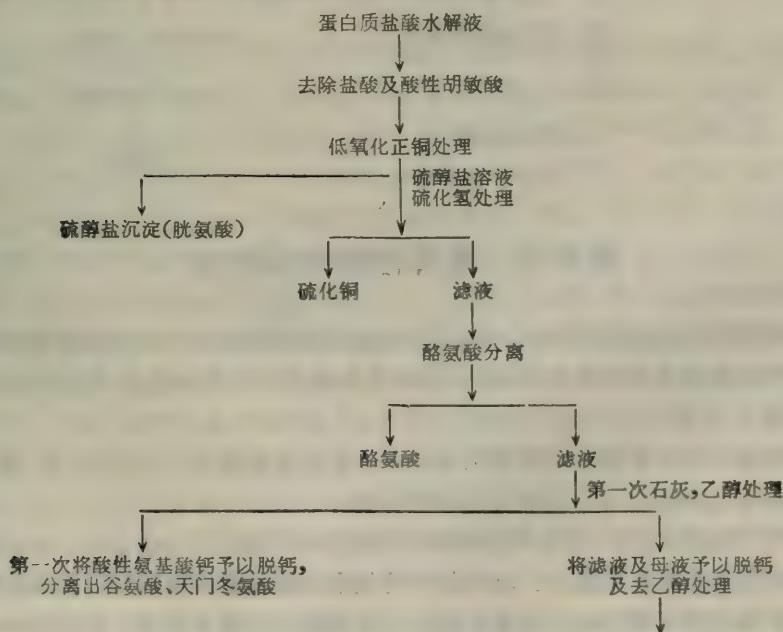
上法用有机溶剂较多, 现多使用热水抽提, 上离子交换树脂柱纯化, 产率较高。举此

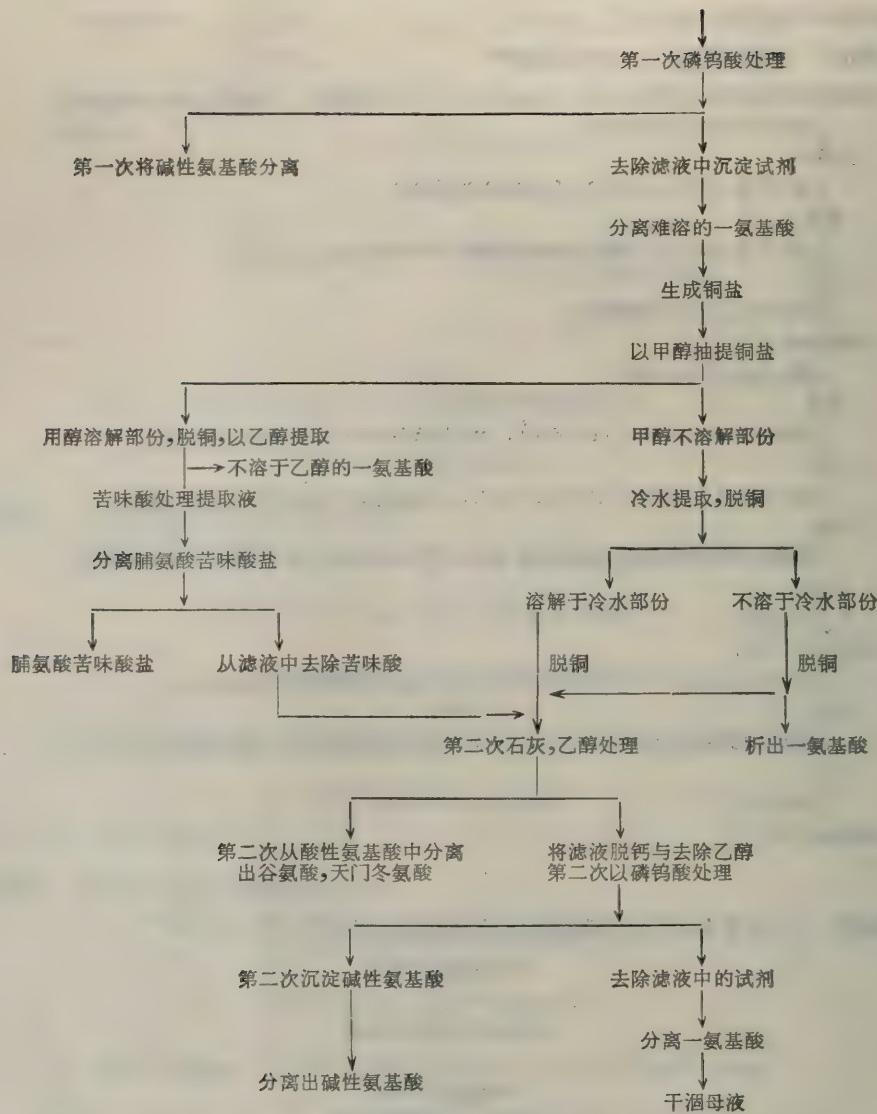
例只说明金属盐沉淀方法而已。

实例四 铜盐法制备 L-异白氨酸^[20]



实例五 盐类复合物沉淀制备酸性及碱性氨基酸^[21]





第六节 选择性变性沉淀法

这一特殊方法主要是破坏杂质，保存目的物。其原理是利用蛋白质、酶和核酸等生物大分子对某些物理或化学因素敏感性不同，而有选择地使之变性沉淀，使达到分离提纯的目的。此方法可分为：

(1) 利用表面活性剂或有机溶剂引起变性。如制备核酸时，加入含水酚、氯仿、十二烷基磺酸钠等有选择地使蛋白质变性与核酸分离。

(2) 利用对热的稳定性不同，加热破坏某些组份，而保存另一些组份。如脱氧核糖核酸酶对热稳定性比核糖核酸酶差，加热处理可使混杂在核糖核酸酶中的脱氧核糖核酸酶变性沉淀。又如由黑曲霉发酵制备脂肪酶时，常混杂有大量淀粉酶，当把混合粗酶液在

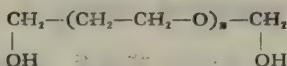
40℃水浴中保温二小时半(pH 3.4), 90%以上的淀粉酶将受热变性而除去。热变性方法简单易行, 在制备一些对热稳定的小分子物质过程中, 除去一些大分子蛋白质和核酸特别有用。

(3) 选择性的酸碱变性。在本章第三节中已述及调节 pH 值除去杂蛋白的方法。利用酸、碱变性有选择地除杂蛋白在生化制备中的例子很多, 如用 2.5% 浓度的三氯醋酸处理胰蛋白酶, 抑肽酶或细胞色素 C 粗提取液, 均可除去大量杂蛋白, 而对所提取的酶活性没有影响。有时还把酸碱变性与热变性结合起来使用, 效果更为显著。但应用前, 必须对制备物的热稳定性及酸碱稳定性有足够的了解, 切勿盲目使用。例如胰蛋白酶在 pH 2.0 的酸性溶液中可耐极高温度, 而且热变性后所产生的沉淀是可逆的。冷却后沉淀溶解即可恢复原来活性。还有些酶与底物或者竞争性抑制剂结合后, 对 pH 值或热的稳定性显著增加, 则可以采用较强烈的酸碱变性和热方法除去杂蛋白。

第七节 非离子多聚物沉淀法

一、基本原理^[24,27]

非离子多聚物是六十年代发展起来的一类重要沉淀剂, 最早应用于提纯免疫球蛋白(IgG) 和沉淀一些细菌与病毒, 近年来逐渐广泛应用于核酸和酶的分离纯化^[22,23]。这类非离子多聚物包括各种不同分子量的聚乙二醇 (Polyethylene Glycol 简写为 PEG), 壬苯乙烯化氧(简写为 NPEO), 葡聚糖, 右旋糖酐硫酸钠等。其中应用最多的是聚乙二醇, 其结构式如下:



根据 X 射线衍射和红外光谱分析, 证明聚乙二醇具有螺旋状的结构。聚乙二醇亲水性强, 有很广范围的分子量, 在生化制备中用得较多的是 PEG6000—20000, 分子量超过 20,000 以上的聚乙二醇, 则具有很高的粘性。操作十分不便, 平时很少使用。聚乙二醇及其他非离子多聚物应用于生物大分子微粒病毒和细菌的沉淀时, 其效果与沉淀剂本身浓度有关外, 还受到离子强度、pH 和温度等因素的影响, 例如, 用 PEG 沉淀蛋白质, 使用 PEG 的浓度与溶液中盐的浓度常呈反比关系, 在固定 pH 值下, 盐浓度越高, 所需的 PEG 浓度越低。溶液 pH 值越接近微粒的等电点, 沉淀微粒所需 PEG 的浓度越低。其次, 使用 PEG 的分子量大小也与沉淀效果有直接关系。在一定范围内, 高分子量的 PEG 沉淀的效力较高。此外, 如使用的 PEG 分子量和浓度相同、沉淀效果与被沉淀微粒的分子大小、形状有关。以上这些现象, 到目前为止, 仍未找到很合适的理论解释。曾提出的假设有如下几种: (1) 认为沉淀作用是多聚物与大分子发生共沉作用。(2) 多聚物使大分子在多聚物与水之间发生分配, 使大分子脱水而沉淀。(3) 多聚物与大分子之间以氢键相互作用形成复合物; 或由于大分子被多聚物包埋形成复合物, 在重力作用下沉淀析出。但以上假设都没有充分根据支持。最近劳兰梯 (Laurent) 等基于多聚物的沉淀作用主要依赖于多聚物的浓度和被沉淀物的分子大小的众多事实。提出 PEG 的沉淀机理主要是通

过空间位置排斥，使液体中的微粒（包括生物大分子、病毒和细菌等）被迫挤聚在一起而引起沉淀的发生^[25,26]。根据上述排斥理论，被排斥的体积、其数值应是多聚物的浓度函数。如多聚物的浓度固定以后，微粒的沉淀则主要和微粒分子大小、形状、带电情况有关。而溶液的温度、pH 值和离子强度正是通过影响微粒分子性质而起作用的。对排斥理论，目前虽有某些异议，但得到较多的实验支持。

水溶性非离子多聚物的沉淀方法，近年来在生化制备应用发展迅速，其主要优点在于：操作条件温和，不易引起生物大分子的变性。同时具有极高的沉淀效能。很少量的非离子多聚物则可以沉淀相当多的生物大分子。沉淀后的多聚物也容易除去。因此广泛应用于细菌、病毒、核酸、蛋白质和酶等多种微粒的沉淀分离。

二、应用方法和范围

用非离子多聚物沉淀生物大分子和微粒，一般有两种方法：一是选用二种水溶性非离子多聚物组成液一液两相系统，使生物大分子或微粒在两相系统中，不等量分配，而造成分离。这一方法主要基于不同生物分子和微粒表面结构不同，有不同分配系数。并外加离子强度，pH 值和温度等因素的影响，从而扩大分离的效果。二是选用一种水溶性非离子多聚物，使生物大分子或微粒在同一液相中，由于被排斥相互凝集而沉淀析出。对后

一种方法，操作时先离心除去粗大悬浮颗粒，调整溶液 pH 值和温度至适度，然后加入中性盐和多聚物至一定浓度，冷处贮一段时间，即形成沉淀。

非离子多聚物沉淀法的应用，主要在下列三方面：

（一）细菌和病毒方面的应用

六十年代初，艾伯森（Albertson）等人用此法分离多种细菌和病毒，他们以葡聚糖和聚乙二醇作为二相系统，经过逆流分配操作先后分离了不同株的大肠杆菌和烟草花叶病毒，脊髓灰白质炎病毒，牛痘病毒和 echo 病毒等^[28]以后，国外用聚乙二醇沉淀分离病毒和噬菌体研究的报导越来越多^[29,30,31]，七十年代我国科学院有关研究所也先后使用此法分离病毒成功。关于各种病毒和噬菌体使用 PEG 沉淀所选用的条件见表 3-6。沉淀后所得的含有病毒沉淀物，可用透析法或逆向 PEG 梯度离心法将病毒分离，制备性的逆向 PEG 梯度组成见图 3-9。含病毒的 PEG 沉淀经离心后，病毒在适当的 PEG 浓度下，则被分配在一狭窄区带内。

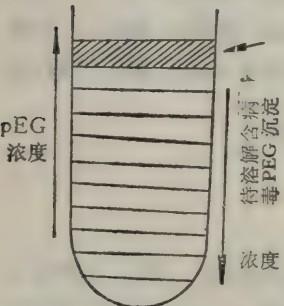


图 3-9 制备性逆向 PEG 梯度组成^[27]

（二）核酸方面的应用

用葡聚糖和聚乙二醇作为二相系统分离单链 DNA、双链 DNA 和多种 RNA 制剂，在六十年代也有过报导。近十多年来发展很快，特别是用聚乙二醇沉淀分离质粒 DNA，已相当普遍^[32]。一般在 0.01M 磷酸缓冲液中加聚乙二醇达 10% 浓度，即可将 DNA 沉淀下来。在遗传工程中所用的质粒 DNA 的分子量一般在 10^6 范围，故选用的 PEG 分子量也常在 6000（即 PEG 6000）因它易与分子量在 10^6 范围的 DNA 结合而沉淀。

表 3-7 用 PEG 和氯化钠沉淀各种病毒的条件^[27]

病 毒 名 称	浓 度		PEG 分子量	沉 淀 作 用 的 条 件
	氯化钠 (M)	PEG (%)		
- 动物病毒				
Echo 29	0.15	15.0	15,000	pH 7.4, 7.6
爱泼斯坦氏-巴尔氏病毒	0.45	8.0	6,000	
口蹄疫病毒	0.15	6.0	20,000	0.02M Tris 缓冲液 (pH 7.6)
流感病毒	0.9	7.5		盐水 (pH 7.4)
		3.7	6,000	
麻疹病毒	0.4	8.0	6,000	
多瘤病毒	0.5	10.0	6,000	
劳斯氏肉瘤	0.4	7.0	6,000	
风疹病毒	0.9	7.5		盐水 (pH 7.4)
猿猴病毒 40	0.5	10.0	6,000	
二 植物病毒				
苜蓿花叶病毒	0.2	8.0	20,000	叶匀浆在 0.2M 磷酸缓冲液中 (pH 6.5) 0.5mM 氯化镁
苹果绿叶斑病毒	—	6.5	6,000	
菜豆莢斑驳病毒	0.2	8.0	6,000	
狼把草斑驳病毒	—	8.0	6,000	0.5M 磷酸缓冲液 (pH 7.5), 0.5% NaSO ₃ , 1M 尿素, 8% n-丁醇
雀麦草花叶病毒	0.08	5.4	6,000	pH 5.0
豇豆花叶病毒	0.2	4.0	6,000	叶匀浆 22°C
豇豆褪绿斑驳病毒	0.24	6.4	6,000	pH 5.0
胡椒斑驳病毒	—	8.0	6,000	0.5M 磷酸缓冲液 (pH 7.5), 0.5% NaSO ₃ , 1M 尿素 8% n-丁醇
马铃薯 Y 病毒	—	8.0	6,000	同上
菸草蚀纹病毒	—	8.0	6,000	pH 7.0
菸草花叶病毒	0.1	4.0	6,000	66mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 5mM 巯基乙醇
菸草花叶病毒	0.3	2.0	6,000	
菸草环斑病毒	0.3	8.0	6,000	
芜菁黃花叶病毒	0.47	6.7	6,000	醋酸缓冲液 (pH 6.0)
白花叶病毒	—	2.0	6,000	0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.5)
三 分枝杆菌噬菌体				
丁酸分枝杆菌	0.5	9.0	6,000	
草分枝杆菌	0.5	6.0	6,000	
路氏分枝杆菌 (V72)	0.5	8.0	6,000	
P ₂₂ H ₃ 噬菌体	0.5	7.0	6,000	
R ₁₇ 噬菌体	0.5	6.0	6,000	
T ₄ 噬菌体	0.2	8.5	6,000	
T ₇ 噬菌体	0.5	6.0	6,000	
φX174 噬菌体	0.5	10.0	6,000	
λ 噬菌体	0.5	10.0	6,000	

(依照 Vaida 所制表格, 删去部份无关的内容)

(三) 蛋白质和酶方面的应用

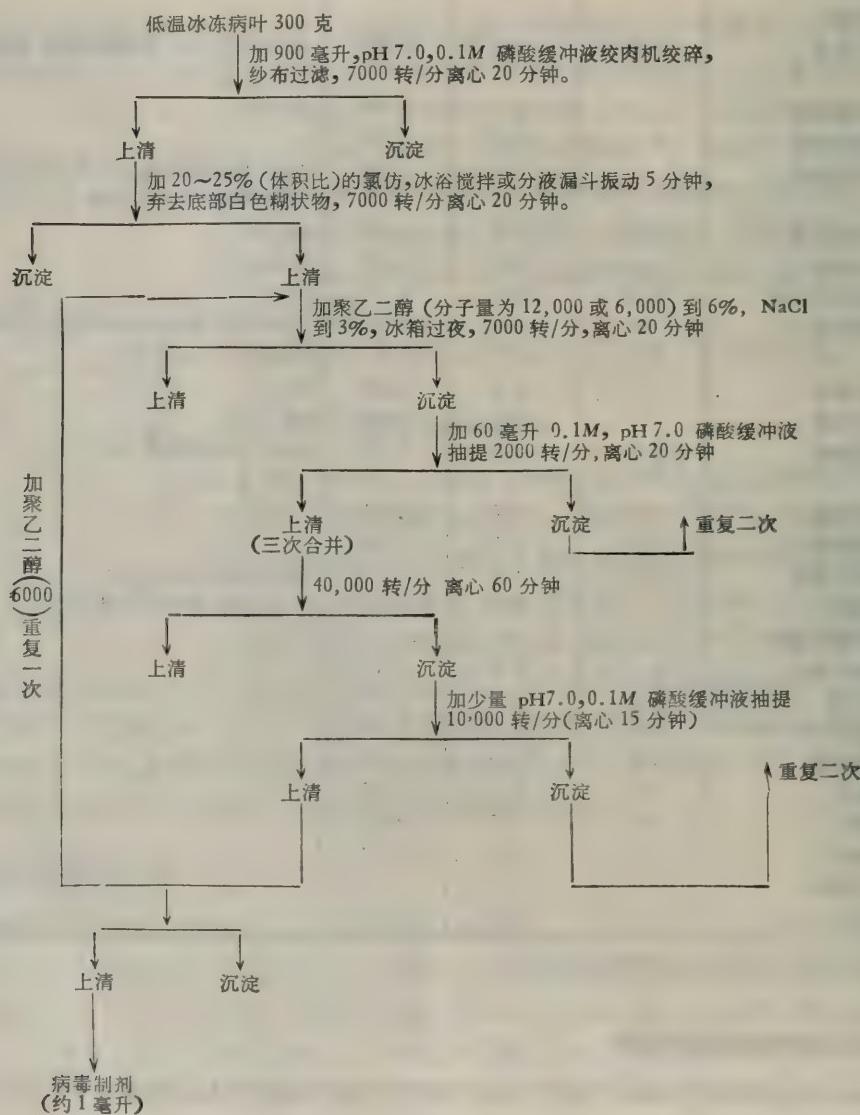
Polson 等人^[33]早在 1964 年已开始使用聚乙二醇分离纯化免疫球蛋白, 以后关于这

方面报导逐渐增多。使用聚乙二醇的分子量多为 2000—6000，多数认为使 PEG 6,000 沉淀蛋白质较好，但是近有报导认为低分子量的 PEG 也获得较好的结果。用聚乙二醇进行酶的沉淀分离，有人认为容易引起变性，早期应用较少，仅有少数例子如黄素蛋白乙醇氧化酶，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶等的分离纯化^[24]。最近又有新的发展，如国内从大肠杆菌中制备 L-天门冬酰胺酶和从小牛肾上腺中制备葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，使用了聚乙二醇沉淀法，获得了很好的效果^[36]。

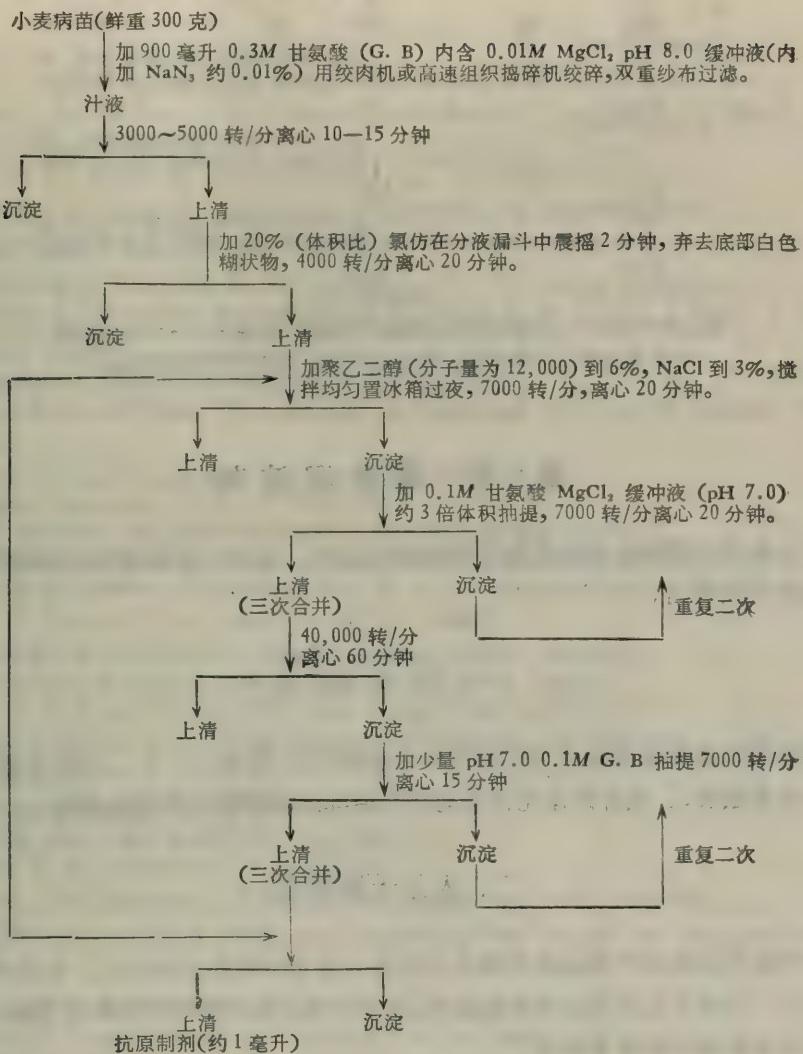
三、应用实例

关于聚乙二醇沉淀分离方法举例如下：

实例一 水稻普遍矮缩病毒的分离^[34]

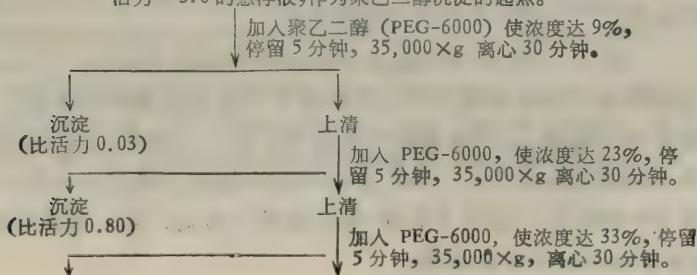


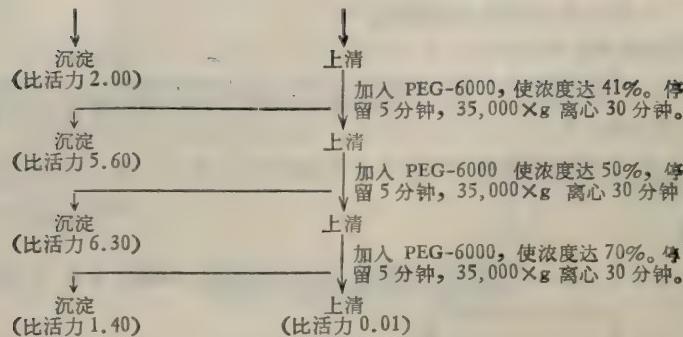
实例二 小麦丛矮病毒抗原的制备^[35]



实例三 肾上腺葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的分步沉淀^[36]

小牛肾上腺体在含有 β -巯基乙醇, EDTA, 甘油的磷酸缓冲液 (pH 8.0) 中,
匀浆, 提取, 离心。上清液加入等量含有 15% 乙醇的醋酸缓冲液中 (pH 4.5)
进行沉淀, 沉淀所得的酶, 再溶于上述提取用的磷酸缓冲液中, 为已提纯 10 倍比
活力 = 3.0 的悬浮液, 作为聚乙二醇沉淀的起点。





以上操作均在 4°C 下搅拌进行, 从图解可见酶活力主要在 41~50% 浓度的 PEG 沉淀部份。沉淀后的 PEG 可以通过 DEAE-纤维素以除去。

第八节 其他沉淀剂

除上述各节应用较普遍的沉淀剂和沉淀方法外, 还有一些沉淀剂和沉淀方法只用于某些物质的沉剂作用。

一、氨基酸类

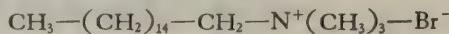
例如使用苯偶氮苯磺酸选择性地沉淀丙氨酸和丝氨酸, 2,4-二硝基苯酚-7-磺酸选择性地沉淀精氨酸, 二氯合硫氰化铬铵选择性地沉淀脯氨酸和羟脯氨酸等。

二、大分子核酸类

多价阳离子鱼精蛋白和硫酸链霉素对带有大量负电荷的核酸分子, 也是两种十分有效的沉淀剂。但由于沉淀后分离比较困难, 成本也高, 较少使用于核酸的制备, 主要用于制备酶时选择性地沉淀除去核酸。

三、粘多糖类

一些粘多糖的沉淀剂, 除了较多地使用乙醇外, 十六烷基三甲基季胺盐的溴化物(简称为 CTAB), 十六烷基氯化吡啶(简称为 CPC)等阳离子表面活性剂也是用于分离粘多糖的有效沉淀剂^[37,38]。CTAB 具有下列结构:



季胺基上的阳离子与粘多糖分子上的阴离子可以形成季胺络合物。此络合物在低离子强度的水溶液中不溶解, 但当溶液离子强度增加至一定范围, 络合物则逐渐解离, 最后溶解。除了离子强度的影响外, CTAB 对各种粘多糖的分级沉淀效果与各种粘多糖硫酸化程度和溶液 pH 值有关。由于 CTAB 的沉淀效力极强, 能从很稀的溶液中(如万分之一浓度)通过选择性沉淀回收粘多糖。

参 考 文 献

- [1] 王世中：生物化学与生物物理进展，第4期，55页(1975)
- [2] Taylor, J. F., The protein, Eds. Neurath, H. and Bailey, K., 1st Ed., Vol. 1, Part A, P. 41, Academic Press, N. Y (1953)
- [3] Czok, R. and Bucher, T., *Advance Protein Chem.*, **15**, 315(1960)
- [4] Dixon, M. and Webb, E. C., *Advance. Protein Chem.*, **16**, 197(1961).
- [5] Green, A. A., *J. Biol. Chem.*, **95**, 47(1932)
- [6] Green, A. A., *J. Biol. Chem.*, **93**, 495 (1931)
- [7] Taylor, J. F., The protein, Eds. Neurath, H. and Bailey, K., 1st Ed., Vol. 1, Part A, p. 54, Academic Press, N. Y (1953)
- [8] 江苏新医学院：生物化学与生物物理进展，第2期，38页(1976)
- [9] Green, A. A. and Hughes, W. L., Methods in Enzymology, Vol. 1, p. 76, Academic Press, N. Y. (1955)
- [10] 阿南功一等：基础生化实验法(2) p. 63,丸善株式会社(1975)
- [11] 杨崇秦等：微生物学报，**19**(1), 96—103页(1979)
- [12] A. R. 别尔林著：有机化学实验操作技术，13页，化学工业出版社 (1952)
- [13] 商业部脏器生化制药情报中心站编著：动物生化制药学 p. 212—214,人民卫生出版社(1981)
- [14] Kaufman, S., Methods in Enzymology, Vol. 22, p. 235, Academic Press, N. Y. (1971)
- [15] Cohn, E. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 459 (1946).
- [16] 中国科学院上海实验生物研究所：生物化学与生物物理进展，1—5页(1975)
- [17] 武汉大学生物化学教研室编：生物化学技术教材，46页(1977)，内部交流
- [18] Gurd, F. R. N. and Wilcox, P. E., *Adv. Protein Chem.*, **16**, 197(1961)
- [19] Horejsi, J. and Smetana, R., *Colln. Czech. Chem. Commune.*, **19**, 1316 (1954); *Acta. Med. Scand.*, **155**, 65 (1956)
- [20] 唐任天等：微生物学报，**18**(1), 45~51页(1978)
- [21] 赤堀四郎,水島三一郎：蛋白质化学，1卷41页(1954)
- [22] Alberts, B. M., *Biochemistry*, **6**, 2527(1967)
- [23] Janssen, F. W. and Ruelius, H. W., *Biochim. Biophys. Acta.*, **151**, 330(1968)
- [24] Fried, M. and Chun, P. W., Methods in Enzymology, Vol. 22, P. 238, Academic Press, N. Y. (1971)
- [25] Laurent, T. C., *Biochem. J.*, **89**, 253(1963)
- [26] Laurent, T. C. and Killander, J., *J. Chromat.*, **14**, 317 (1964)
- [27] Vajda, B. P., *Folia Microbiol.*, **23**, 88(1978)
- [28] Albertsson, P.- A. and Frick, G., *Biochim. Biophys. Acta.*, **37**, 230 (1960)
- [29] Herbert, T. T., *Phylopathology*, **53**, 361 (1963)
- [30] Venekamp, J. H. and Mosch, W. H. M., *Virology*, **22**, 503(1964)
- [31] Yamamoto, K. R., Alberts, B. M. et al., *Virology*, **40**, 734(1970)
- [32] Hampshire, G. O. et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, **383**, 457 (1976).
- [33] Polson, A., potgieter, G. M. et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, **82**, 463 (1964)
- [34] 中国科学院上海生物化学研究所：生物化学与生物物理学报,Vol. 10. No. 4(1978)
- [35] 中国科学院上海生物化学研究所：生物化学与生物物理学报, Vol.11, No. 1(1978).
- [36] Criss, W. E. and McKerns, K. W., *Biochemistry*, **7**, 125(1968).
- [37] Frank, M. D. and Dunstone, J. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 555 (1968).
- [38] Toole, B. P. and Lowther, D. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 567(1968).

第四章 生物小分子常用色谱分离法

程明哲 苏拔贤

我们所需的生物体组成成份，经过溶剂提取初步分离，常选用沉淀方法进行粗分及浓缩，接着上柱色谱分离，或者不经沉淀分离直接上柱进行色谱纯化。在现代生化制备技术中，色谱分离占有核心地位。色谱方法按分离机制的不同可分为吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、凝胶过滤(或分子筛)色谱和亲和色谱等。用于制备量色谱要求一次进样量大并容易回收，故常用柱型色谱，板状薄层色谱也常用于小量样品的制备，且有快速，操作简便的优点。
[172]

应用色谱分离方法制备的生物体组成成份，包括各种初级代谢产物如氨基酸、核苷酸、单糖类、有机酸、脂肪酸；次级代谢产物如生物碱、萜类、糖苷、精油、色素和鞣质类以及各种组成生物体的大分子如蛋白质、多肽、酶、核酸、多糖等。这些物质使用色谱分离制备时，常根据它们之间分子结构和化学特性，分子量大小以及在色谱分离过程中生理活性的稳定情况，选择不同色谱方法。蛋白质、酶、核酸等生物大分子由于它们分子量大，容易在操作中失去生理活性，同时这些大分子常常具有与其结构相对应的专一分子可逆地结合的特性(或称生物亲和性)，较多地选用多糖基离子交换色谱、分子筛色谱和亲和色谱法，这几种色谱方法，将在本书第五章介绍。而一些代谢产物即各种类型的生物小分子，由于它们分子量小，结构和性质比较稳定，操作条件要求不太苛刻，采用吸附、分配柱色谱和离子交换柱色谱进行分离较为适宜。其中氨基酸、核苷酸、有机酸等一些离子化合物的制备多用离子交换色谱法，而生物碱、萜类、苷类、色素等次生代谢小分子则多采用吸附色谱法或反相分配色谱法分离。现根据一些发表的资料，统计近年来植物化学成份应用色谱分离技术的情况如下^[1]：

分离手段	应用色谱技术占总的分离方法百分数
硅胶柱色谱	49.4%
制备量薄层色谱	16.4%
氧化铝柱色谱	10.1%
溶剂法	7.3%
聚酰胺柱色谱	4.5%
离子交换柱色谱	3.8%
纤维素柱色谱	1.9%
制备量气相色谱	1.3%
其他方法	5.3%

由上列百分比可以看出，经典色谱方法在天然药物的分离制备中仍占很大比例，尤以硅胶柱色谱方法使用情况最多，其次是各种制备薄层色谱。

色谱技术近年发展很快，各种固定相填料(或称支持剂)型号日益增多，分离性能越来越好，各种色谱附加的检验系统如紫外和可见光吸收分光计，折光计，荧光计等装置日

趋完善，特别是高效液相色谱系统装置的出现（包括分配与吸附，离子交换，凝胶过滤等高效液相色谱），不论在柱分离效率上，仪器自动化程度上，或者在应用广泛性上都远远超过了其他经典色谱方法。已成为当前生化分离制备最有效的手段之一。本章将结合生物小分子的分离制备介绍吸附色谱法、离子交换色谱法和高压液相色谱法。

但应该指出的是：根据分子大小和某些化学性质分别选择使用不同色谱法，并不意味着某一色谱方法只适用于某一类物质，只能说某类物质较多地使用某一色谱法。例如，高效液相色谱最初只应用于小分子物质，最近出现使用了凝胶固相及改进了仪器结构，应用于生物大分子的分离已越来越多。又如吸附色谱法，较多用于小分子的分离，但其中磷酸钙凝胶吸附柱色谱却十分适用于蛋白质的分离，迄今还是工业上和实验室大量制备酶的常用方法之一，亲和色谱方法绝大多数情况用于生物大分子的分离制备，但反过来以大分子酶作配基，相对应地吸附一些小分子辅基或酶的底物，也是可以的，只是使用机会较少而已。

第一节 吸附色谱法

吸附色谱法是指混合物随流动相通过吸附剂时，由于吸附剂对不同物质有不同的吸附力而使混合物分离的方法。

吸附色谱法是最早期的一种色谱分离技术。1903年俄国植物学家 Цвет用菊根粉柱研究植物色素的提取物，以石油醚冲洗，得到分离的黄色、绿色区带，故称为色谱分离法。1931年又有人用氧化铝柱分离了胡萝卜素的两种同分异构体，显示了本法具有较高的分辨率，同时，吸附色谱法操作较简单，不需特殊的实验装置，分离物质的量小至毫克，大至上百克，主要应用于某些分子量不大的物质的分离提纯。个别的（如羟基磷灰石）也适用于生物大分子的分离提纯，应用范围比较广。本法虽然比较古老，但目前仍有其实用的意义。特别是一些新的改良的吸附剂的出现，结合快速的分离和监测器，如高效液相吸附色谱法的发展，赋予吸附色谱技术更新的生命力。

一、吸附过程的本质

吸附是表面的一个重要性质之一。任何两个相都可以形成表面，其中一个相的物质或溶解在其中的溶质在此表面上的密集现象称为吸附。在固体与气体之间，固体与液体之间，吸附液体与气体之间的表面上，都可以发生吸附现象。

凡能够将其他物质聚集到自己表面上的物质，都称为吸附剂，聚集于吸附剂表面的物质就称为吸附物。既然吸附是发生在表面上的表面现象，因此要了解固体吸附剂的吸附作用的本质，就要了解固体的表面特性。

为什么分子能在固体表面停留一定时间呢？这是因为固体表面上的分子（离子或原子）和固体内部分子所受的吸引力不相等。在内部的分子，分子之间相互作用的力是对称的，其力场互相抵消，而处于固体表面的分子所受的力是不对称的，向内的一面受到固体内部分子的作用力大，而表面层所受的作用力小，因而气体或溶质分子在运动中碰到固体表面时受到这种剩余力的影响，就会被吸引而停下来。

在不同条件下，吸附剂与被吸附物之间的作用，既有物理作用的性质又有化学作用的特征。物理作用又称范德华吸附，是分子间相互作用的范德华力所引起的，其特点是无选择性，吸附速度快，吸附的过程是可逆的，伴随放出的能量较小，吸附不牢，吸附的分子是单层或多层的。化学吸附主要是由原子价力（化学键）的作用引起的，如电子的转移或分子与表面共用电子对等。其特点是有选择性，吸附速度较慢，不易解吸，放能大，一般吸附的分子是单层的。物理吸附和化学吸附可以同时发生，在一定条件下也可以互相转化。

由于吸附过程是可逆的，因此被吸附物在一定条件下可以解吸出来。在单位时间内被吸附于吸附剂的某一表面积上的分子和同一单位时间内离开此表面的分子之间可以建立动态平衡，称为吸附平衡。吸附色谱法过程就是不断地产生平衡与不平衡，吸附与解吸的矛盾统一的过程。

二、常用吸附剂的特性和应用

（一）硅胶

是应用最广泛的一种极性吸附剂，它的主要优点是化学惰性，具较大的吸附量，易制备不同类型、孔径、表面积的多孔性硅胶，一般以 $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 通式表示。

硅胶制备是将硅酸钠溶液酸化，产生硅溶胶，同时发生絮凝作用，放置一定时间（陈化）后，收集沉淀，充分洗去可溶性杂质，干燥磨碎。用前要在 $150\sim 200^\circ\text{C}$ 加热活化。絮凝作用的速率取决于 pH。在 pH 3—4 时，絮凝作用缓慢，产生了大的表面积硅胶（800 米²/克）；而在 pH 6 时，絮凝作用很快，产生的硅胶结实致密，其比表面积 < 400 米²/克。

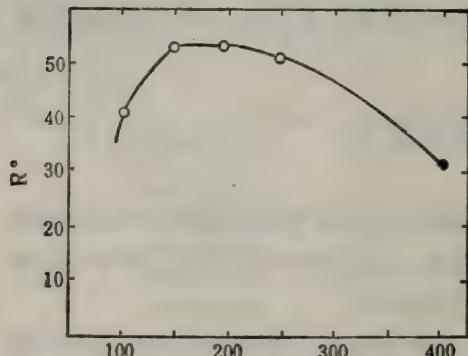


图 4-1 吸附活性 (R°) 随活化温度的变化

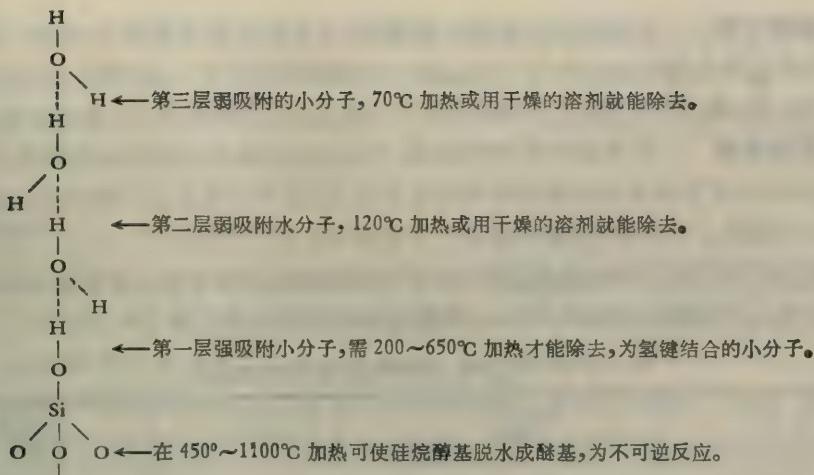
戊烷对萘的洗脱

- 在 N_2 中活化 15 分钟，
- 在空气中活化 16 小时

硅胶的吸附活性取决于其含水量，吸附色谱法一般采用含水量 10~12% 的硅胶，当含水量小于 1% 时活性最高，而大于 20% 时，吸附活性最低。用加热脱水法可使硅胶活化。图 4-1 表示加热活化温度与吸附活性之间的关系。

当加热到 150°C 时，吸附剂失去物理结合的水，活性上升，在 $150\sim 250^\circ\text{C}$ 时，吸附活性几乎恒定，而当加热到 $250\sim 400^\circ\text{C}$ 时，失去硅烷醇基上的水，这是化学结合水，从而使吸附活性下降，加热 400°C 以上时，由于部分相邻的硅烷醇基的脱水，形成了硅氧烷桥，另外部分硅胶颗粒的熔结，而使吸附活性迅速下降，而且部分不可逆，至 1000°C 时，成为无水 SiO_2 ，失去活性，因此硅胶的热活化通常在小于 250°C 下进行。

降低活性的硅胶（纯化）能显著改善分离性能，增加样品的负载量。Scott 等⁽⁴⁾ 认为硅胶是由三层小分子覆盖在表面上，如下图式所示：



活性硅胶是指在 150~195℃ 加热活化后覆盖有第一层小分子的硅胶, 对样品溶质分子有较强的吸附作用, 其缺点是活性部位非均匀性, 样品的线性容量明显地小, 甚至产生催化反应或不可逆吸附。采用加水纯化的办法可解决, 一般 100 米²/克比表面积的吸附剂, 加水 1~2% 相当覆盖 30~60% 的吸附剂表面, 能提高 5~100 倍样品负载量。

实验表明, 加入 4~20% 水的硅胶, 能提高柱效。这是因为加水后, 表面活性部位净化, 加快了样品溶质在吸附剂上的吸附和解吸过程, 另外, 由于硅胶上的细孔被水“堵住”, 也改善了传质作用。

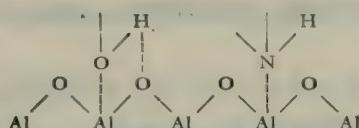
硅胶的吸附活性测定可用偶氮染料法, 含水量与吸附活性的关系见表 4-1^[5]。

硅胶的再生: 用过的硅胶用 5~10 倍量的 1% NaOH 水溶液回流 30 分钟, 热过滤, 然后用蒸馏水洗三次, 再用 3~6 倍量的 5% 醋酸回流 30 分钟, 过滤, 用蒸馏水洗至中性, 再用甲醇洗、水洗二次, 然后在 120℃ 烘干活化 12 小时, 即可重新使用。

(二) 氧化铝

以氧化铝作为吸附剂的色谱法适用于亲脂性成分的分离制备。氧化铝具较高的吸附容量, 价格低廉, 分离效果好, 因此应用也较为广泛。

氧化铝的吸附原理一般认为是物质与氧化铝表面上的羟基形成氢键(如下式), 铝原



子提供亲电子中心, 从而吸引电子供体基团(如 -OH, -NH)。

影响氧化铝吸附色谱法的因素很多, 操作时要注意选择具适当活性及适当的酸碱度的氧化铝。

用于吸附色谱法的氧化铝通常可按制备方法的不同而分为以下三种:

1. 碱性氧化铝 直接由氢氧化铝高温脱水而得, 柱色谱法一般用 100~150 目。一般水洗脱液的 pH 为 9~10, 经活化后即可使用。碱性氧化铝主要应用于碳氢化合物的分离, 从碳氢化合物中除去含氧化合物以及某些中性、碱性物质的分离。

2. 中性氧化铝 用碱性氧化铝加入蒸馏水，在不断搅拌下煮沸 10 分钟，倾去上清液。反复处理至水洗液的 pH 为 7.5 左右，滤干活化后即可使用。中性氧化铝使用范围最广，适用于醛、酮、醌、某些苷类及在酸碱溶液中不稳定的酯、内酯等化合物的分离。

3. 酸性氧化铝 氧化铝用水调成糊状，加入 2N 盐酸，使混合物对刚果红呈酸性反应。倾去上清液，用热水洗至溶液对刚果红呈弱紫色，滤干活化备用。酸性氧化铝适用于天然和合成的酸性色素以及醛、酸的分离。水洗液 pH 为 4—4.5。

氧化铝的吸附活性与含水量关系很大，在一定的温度下除去水分可使氧化铝活化，加入一定量的水又可使氧化铝活性改变。活性与含水量的关系见表 4-1。

表 4-1 氧化铝、硅胶、硅酸镁的活性与含水量关系

活性	氧化铝 (水%)	硅胶 (水%)	硅酸镁 (水%)
I 级	0	0	0
II 级	3	5	7
III 级	6	15	15
IV 级	10	25	25
V 级	15	35	35

氧化铝活性的测定可采用薄层色谱法，按表 4-2，所列的 R_f 值确定活性级别。

表 4-2 测定氧化铝活性的 R_f 值

偶氮染料	按 Brockmann 和 Schodder 划分活性 ^[5]			
	II	III	IV	V
偶氮苯	0.59	0.74	0.85	0.95
对-甲氧偶氮苯	0.16	0.49	0.65	0.89
苏丹黄	0.01	0.25	0.57	0.78
苏丹红 (III)	0.00	0.10	0.33	0.56
对-氨基偶氮苯	0.00	0.03	0.08	0.19

(三) 活性炭

活性炭的来源可分为动物炭，植物炭和矿物炭(煤)三种，分别用动物的骨头、木屑、煤屑高温炭化而成。市售活性炭大多数以木屑为原料，加氯化锌在 700~800℃ 高温炭化并活化，经适当处理除杂质而成。

根据其粗细程度活性炭可分为以下三种：(1) 粉末活性炭：颗粒极细，呈粉末状，比表面积大，吸附量及吸附力大，但因颗粒太细，流速慢，故一般柱色谱法极少用。(2) 颗粒活性炭：颗粒较大，其比面积及吸附力都较粉末活性炭小，但易控制流速，便于装柱使用，故在柱色谱法中应用较广。(3) 锦纶一活性炭：以锦纶为粘合剂将粉末活性炭制成颗粒，比表面积介于粉末活性炭和颗粒活性炭之间，吸附能力较两者弱。一般用于前两种因吸附力太强而不易洗脱的物质。

活性炭的吸附作用，在水溶液中吸附力最强，在有机溶剂中吸附力较弱。在一定条件下，对不同的物质的吸附力不同，一般说对极性基团(如 COOH、-NH₂、-OH 等)多的化合物的吸附力大于极性基团少的化合物。在酸性溶液中活性炭的吸附力大，在 pH 6.8

以上，吸附能力较差。活性炭在水溶液中对同系列有机化合物的吸附量，随吸附物的分子量增大而增大。活性炭对化合物的吸附力一般认为主要为范德华力。

活性炭用前需活化，一般在 150℃ 加热 4—5 小时，将吸附的大部分气体除去，对于锦纶活性炭，因易受热变形，活化时常不超过 100℃。

(四) 聚酰胺

聚酰胺是一类化学纤维原料，国外名称“尼龙”，我国名称“锦纶”。由己二酸与己二胺聚合而成的叫锦纶 66。由己内酰胺聚合而成的叫锦纶 6。因为这两类分子都含有大量的酰胺基团，故统称聚酰胺。

聚酰胺柱色谱特别适用于低分子量化合物的分离。如对酚、羧酸、DNP-氨基酸、醌及芳香族硝基化合物的分离是一个良好的吸附剂。它们的吸附等温线在较广浓度范围内是成线性的。

聚酰胺具有特异的色谱分辨能力，它对极性化合物的吸附作用，是由于聚酰胺与被分离物之间形成氢键，如酚类和酸类是与其羟基与酰胺键的羰基的氧形成氢键。被分离物质形成氢键能力的强弱，决定了吸附力的大小。在色谱过程中，洗脱剂与被分离物质在聚酰胺粒子表面上竞争形成氢键，可选择适当的洗脱剂，使被分离物质在洗脱剂与聚酰胺表面之间的分配系数有最大差异。经过吸附与解吸的色谱过程，就可使化合物与杂质分离开来。

聚酰胺与化合物形成氢键的能力也与所用的溶剂有关，一般在水中形成氢键能力最强，而在有机溶剂中形成氢键能力较弱。在碱性溶剂中形成氢键能力最弱。

聚酰胺的吸附活性可用其对 β -萘酚橙的吸附力大小表示。

(五) 聚苯乙烯吸附剂

Amberlite XAD 是一个合成的非极性吸附剂，它由苯乙烯和二乙烯苯共聚合而成。它的比表面积达 300 米²/克，孔径约 90 Å，虽然它是多孔的，但溶解物质穿透进孔内的能力很弱，吸附作用主要发生在吸附剂表面上。聚苯乙烯对化合物的吸附作用是基于化合物的疏水基与非极性吸附剂之间的范德华力作用。

聚苯乙烯吸附剂已成功地应用于肉香味前体的水溶液分离；除去过量的蛋白质沉淀剂苦味酸；硝基和氯酚的分离，Amberlite XAD-2 也用于高效液相色谱的固定相^[6]。

(六) 磷酸钙

在无机吸附剂中，磷酸钙是唯一的适用于生物活性高分子物质（如蛋白质，核酸）的分离的吸附剂。

Swingle 等用蔗糖钙的水溶液加入磷酸，得到磷酸钙沉淀，用于蛋白质的色谱分离，但为了获得适当的流速，需掺加硅藻土。后来，Tiselius 用 0.5M CaCl₂ 加 0.5M 磷酸二钠盐，在室温下反应，得到满意的流速的磷酸钙。 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 在 pH 7 以上，慢慢变为羟基磷灰石，则 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 放出 H_3PO_4 。Levin 等叙述了羟基磷灰石的制备方法^[7]。

羟基磷灰石主要适用于蛋白质的色谱分离，也适用于较小分子的核酸，如转移 RNA 的分离。

Bernardi 等用几个合成的多聚氨基酸在羟基磷灰石上进行色谱分离，以磷酸盐梯度洗脱，研究其对蛋白质的吸附机制，又研究几种蛋白质在 8 M 尿素存在下或无尿素下的色谱分区性质，最后指出，磷酸钙对蛋白质吸附的机制是溶质的酸性基团与在洗脱液中的磷酸根离子对吸附剂的阳离子钙的竞争性作用。对核酸分子的吸附机制也与蛋白质类似，多核苷酸的负电性磷酸基与羟基磷灰石结晶表面上的阳离子钙之间的相互作用，糖和碱基没有直接影响。例如，嘌呤和嘧啶碱及其相应的核苷在羟基磷灰石柱上没有阻留作用（用 0.001M 磷酸缓冲液平衡）。而单核苷酸则稍有阻滞，对二和三磷酸酯则需较高磷酸盐浓度才能洗脱下来。多聚核苷酸从羟基磷灰石上的洗脱是由于缓冲液的无机磷离子和溶质的磷残基之间对吸附剂上钙离子的竞争作用。

羟基磷灰石对于分辨有次序和无次序的生物大分子结构（包括蛋白质和核酸）是很有用的一个吸附剂。生物大分子从有序到混乱的螺旋变性结构过程中常常伴随着电荷密度的降低，这可能是由于破坏了高级结构，离子基团间的静电排斥的结果所引起的。

三、吸附柱色谱的实验技术

（一）吸附剂的选择及处理

吸附剂的选择是吸附色谱法中的关键问题，选择不当，达不到要求的分离效果。因为作为吸附色谱中的吸附剂种类很多，无机吸附剂有硅胶、氧化铝、活性炭、硅酸镁、氧化镁、碳酸钙、磷酸钙等。还有一些人工合成的硅铝酸盐（如人造沸石）；有机吸附剂有纤维素、淀粉、蔗糖、聚酰胺等。而对吸附剂的选择尚无固定的法则，一般需通过小样实验来确定，但要注意，同一种吸附剂因制备及处理方法不同，吸附性能有很大差别。例如，活性炭在 500°C 活化后吸附酸而不吸附碱，但在 800°C 活化者却易吸附碱而不吸附酸；硅胶，磷酸钙凝胶的吸附能力与陈化程度有关。

一般来说，所选吸附剂应有最大的比表面积和足够的吸附能力，它对欲分离的不同物质应有不同的吸附能力，即有足够的分辨力；与洗脱剂、溶剂及样品组分不会发生化学反应，还要求所选的吸附剂颗粒均匀。在操作过程不会破裂。吸附的强弱可概括如下：吸附现象是与两相间界面张力的降低成正比，某物质自溶液中被吸附程度与其在溶剂中的溶解度成反比，极性吸附剂易吸附极性物质，非极性吸附剂易吸附非极性物质，同族化合物的吸附程度有一定的变化方向，例如，同系物极性递减，因而被非极性表面吸附的能力将递增。

许多吸附剂一般先经过筛取得较均匀的颗粒（100—200 目），对含有杂质的吸附剂，可用有机溶剂如甲醇、乙醇、乙酸乙酯等浸泡处理或提取除去，有些吸附剂可用沸水洗去酸碱使呈中性，有些需经加热处理活化。

（二）溶剂与洗脱剂

溶剂与洗脱剂实用上常为同一组分，但用途不同。习惯上把用于溶解样品的溶液称溶剂。把用于洗脱吸附柱的溶液称洗脱剂。原则上所选的溶剂和洗脱剂要求纯度合格，与样品和吸附剂不起化学反应，对样品的溶解度大，粘度小，易流动，易与洗脱的组分分开。常用的溶剂与洗脱剂有饱和碳氢化合物、醇、酚、酮、醚、卤化烷、有机酸等。选择溶剂

与洗脱剂时,可根据样品组分的溶解度、吸附剂的性质、溶剂极性等方面来考虑,极性大的洗脱能力大,因此可先用极性小的作溶剂,使组分易被吸附,然后换用极性大的溶剂作洗脱剂,使组分易从吸附柱中洗出。

表 4-3 按介电常数反映的极性递增顺序列出了各种常用溶剂。

表 4-3 溶剂的脱附系列(按极性递增排列)

溶剂	介电常数(25°C)	溶剂	介电常数(25°C)
己烷	1.89	冰乙酸	6.15
庚烷	1.92	四氢呋喃	7.58
环己烷	2.02	二氯甲烷	9.14
1,4-二氧六环	2.21	α -甲基丙醇(2)	10.9
四氯化碳	2.24	吡啶	12.3
苯	2.28	丁醇	15.8
甲苯	2.38	α -甲基丙醇(1)	17.7
乙腈	3.88	丁醇	17.8
乙醚	4.34	丙醇(2)	18.3
三氯甲烷	4.87	丙醇(1)	20.1
甲酸	5.0	丙酮	20.7
α -甲基丁醇	5.82	乙醇	24.3
乙酸乙酯	6.02	甲醇	33.6

(三) 柱的装填和样品的加入

吸附色谱法通常采用柱型装置,色谱柱一般为玻璃或有机玻璃管制成,柱下端装上一块2—4号烧结玻璃或垫一层玻璃丝以支持吸附剂。柱高与直径比根据实验的要求而定。管内装吸附剂。管顶可与样品溶液或洗脱液贮液瓶连接,下端可用活塞或用胶管连接排出管,并在胶管上装置螺旋夹以控制流速。有条件可附加压或减压装置,使流速保持恒定,色谱柱外也可配恒温管套。

装柱的方法通常是将一种在适当溶剂中的吸附剂调成糊状,慢慢地倒入关闭了出水口的柱中,同时不断搅拌上层糊状物,赶去气泡,并使装填物均匀地自然下降,装置所需要的高度后,打开出水口,让溶剂流出。注意柱的任何部分不能流干,即是说,在柱的表面始终就保持着一层溶剂。

小心地用移液管把样品液沿绕柱内壁小心地加入,不要冲击着吸附剂的表面。加样的另一个办法是用一个注射器或蠕动泵把样品直接送到柱表面上。

(四) 洗脱

在整个洗脱过程中,要使洗脱液通过柱时保持恒定的流速,可以用调节“操作压”来控制(操作压相当于在柱上部的贮液瓶中溶剂的水平和柱出水口位置的水平之差)。另一个办法是使用蠕动泵。

洗脱过程中柱内不断发生溶解(解吸),吸附,再溶解,再吸附。被吸附的物质被溶剂解吸,随着溶剂向下移动,又遇到新的吸附剂又把该物质自溶剂中吸附出来,后来流下的

新溶剂又再使该物质溶解而向下移动。如此反复解吸，吸附，经一段时间后，该物质向下移动至一定距离，此距离的长短与吸附剂对该物质的吸附力及溶剂对该物质的溶解能力有关，分子结构不同的物质溶解度和吸附能力不同，移动距离也不同，吸附较弱的就较易溶解，移动距离较大。经过适当时间后，各物质就形成了各种区带，每一区带可能是一种纯的物质，如果被分离物质是有色的，就可以清楚地看到色层。随着洗脱剂向下移动，最后各组分按吸附力的不同顺序流出色谱柱，以流出体积对浓度作图，可得由一系列峰组成的曲线，每一峰可能相当于一个组分。

如果样品中含组分较多，某些组分吸附力相近，易形成两峰重叠间界限不清，可采用梯度洗脱法。

第二节 离子交换色谱法

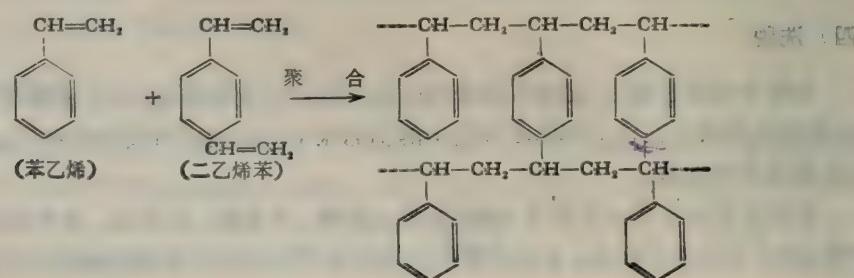
离子交换作用是指一个溶液中的某一种离子与一个固体中的另一种具有相同电荷的离子互相调换位置，即溶液中的离子跑到固体上去，把固体上的离子替换下来。这里，溶液称流动相，而固体称固定相。

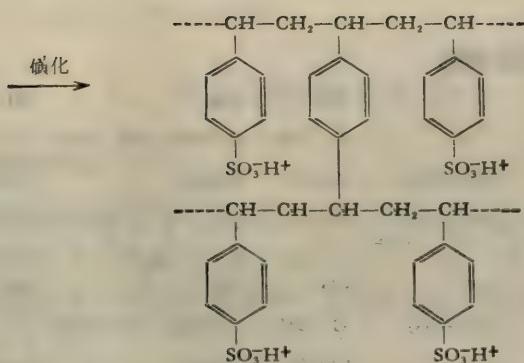
自从人类远古的时代，就知道利用这种离子交换现象，例如用砂粒来净水。但真正了解这种离子交换现象的机制以及在实验上的广泛应用则要到十九世纪以后。1950—1955年期间出现了以聚丙烯为母体的阳离子和阴离子交换剂，使离子交换层析技术得到迅速发展。目前，离子交换剂已发展到数百种，各种离子交换色谱法已成为最广泛应用的色谱方法之一。

一、离子交换剂的类型

(一) 聚苯乙烯阳离子和阴离子交换树脂

这是最重要的一类离子交换树脂，由苯乙烯和二乙烯苯的共聚物作为骨架，再引入所需要的酸性基或碱性基。例如聚苯乙烯磺化型阳离子交换树脂是由苯乙烯(母体)与二乙烯苯(交联剂)共聚后再磺化引入磺酸基而成的。其中苯乙烯是主要成分，形成网的直链，其上带有可解离的磺酸基，而二乙烯苯把直链交联起来形成网状结构，所得的产物有像海绵似的结构，磺酸根连在树脂上，氢离子与磺酸根的负电荷互相平衡，颗粒内部就像一个苯磺酸的浓溶液，只是负性根不能自由移动，只有氢离子才能与外来的离子相互交换。



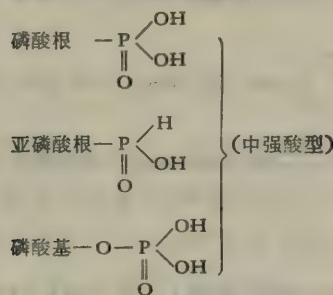


调节加入不同的悬浮液稳定剂和控制介质的温度、粘度及机械搅拌速度可得到不同大小规格的树脂(直径从1微米至2毫米)，而改变二乙烯苯的量则可得到不同交联度的树脂。

根据引入的可离解基团的性质又可分为下列两类离子交换树脂。

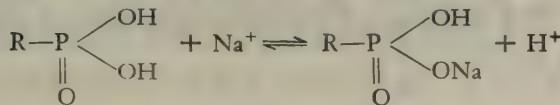
1. 聚苯乙烯阳离子交换树脂 这类交换剂可再分为强酸型、中强酸型及弱酸型三种，各含有以下的可解离基团。

磺酸基 $-\text{SO}_3\text{H}^+$ (强酸型)



羧基 $-\text{COOH}$ (弱酸型)

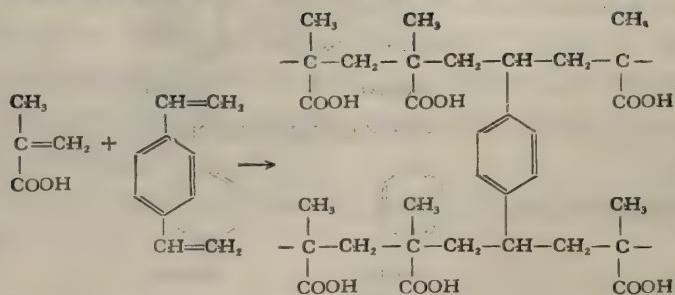
这些交换剂在交换时氢离子为外来的阳离子所取代，如下式所示：



2. 聚苯乙烯阴离子交换树脂 也可再分为强碱性、中强碱性及弱碱性三类，这三类都是含有胺基，碱性的强弱按胺基碱性强弱而分。如含季胺盐 $[-\text{N}^+(\text{CH}_3)_4]$ 为强碱性、叔胺 $[-\text{N}(\text{CH}_3)_2]$ 、仲胺 $[-\text{NHCH}_3]$ 、伯胺 $[-\text{NH}_2]$ 类都属弱碱性、既含强碱性基团又含弱碱性基团即为中强碱性，交换时反应如下：

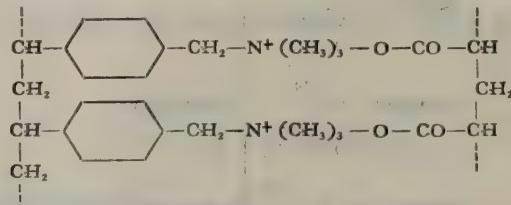


(二) 聚丙烯酸阳离子交换树脂



是由甲基丙烯酸和二乙烯苯聚合而成。这类树脂具高度的交换量，每克干重树脂可交换 10 毫克当量物质。在 pH 8 以下，这类树脂中的羧基不完全解离，因此要在高的 pH 值下树脂才有完全的交换量，由于相邻羧基距离较短而产生的缔合作用，故有很高的表观 pK 值，在低离子强度下特别明显。这种高度缔合的非离子化羧基使树脂的表面形成一个亲水层，对极性分子能起一种很有效的吸附作用。

由丙烯酸或甲基丙烯酸在季胺型阳离子交换树脂（如 Dowex 1）中聚合而成的一类树脂称“蛇笼树脂”（Snake-Cage resins）结构如下：



由于树脂中的羧基 ($-COO^-$) 和季胺基 [$-N^+(CH_3)_3$] 是等当量的，故树脂在反应上的中性的。这类树脂可用于生物化学上的脱盐，例如一个 NaCl 溶液通过这类树脂柱，则 Na^+ 为树脂中的 $-COO^-$ 除去，而 Cl^- 则为季胺基除去，故脱盐后的溶液没有明显的 pH 改变，随后用水洗柱即可回收盐。这类树脂也可用来从电解质中分离非电解质，因为非电解质直接通过柱流出。另外也用于从大分子的等电点两性电解质中分离电解质，因为前者不能进入树脂的网孔中。

(三) 其他离子交换剂

例如选择性离子交换剂是利用某些特殊的有机试剂可与某些金属离子起选择性反应的原理而制备的。

鳌形树脂是利用金属离子与有机试剂生成鳌形化合物的性质而制备的。如用含汞的树脂分离含巯基的化合物（辅酶 A，半胱氨酸、谷胱甘肽等）。

吸附树脂是一类有很大的表面积，吸附能力强，但离子交换的能力很小的树脂主要用于脱色和除去蛋白质等，也称为“脱色树脂”。

电子交换树脂，这类树脂所交换的不是离子而是电子，交换反应是个氧化还原反应，也称“氧化还原树脂”。可用于氧化剂或还原剂再生，由于上述几种离子交换剂与生化物

质的分离制备关系不大，这里不作详细介绍。

二、离子交换树脂的性质

(一) 一般离子交换剂的特性

1. 多孔性 树脂为疏松的，多孔的网状物质，而活性基团一般都处于树脂网孔内，外来离子必需进入到网孔内才能进行离子交换。

2. 不溶性 树脂在水中及稀酸、稀碱和一般有机溶剂中都不溶解，经常维持其立体网状结构。

3. 稳定性 离子交换树脂具有强稳定的化学性质，母体本身不与酸、碱起作用。例如强酸型阳离子交换树脂（Dowex50，国产732树脂等）很稳定，可使用几百次，其交换当量改变不大，又可长时间浸泡于5% NaOH, 0.1% KMnO₄, H₂O₂, 0.1N HNO₃中，耐热性较好，可在100°C左右处理。一些强碱性阴离子交换树脂（如Dowex 1，国产717#树脂等）对酸碱及有机溶剂稳定，但在浓HNO₃中不稳定。一般游离型（即-OH型）树脂，其耐热性较差（不超过45°C）而制成盐型（Cl型）则耐热性大大提高，可耐受100°C处理。

4. 离子交换性 离子交换树脂必需具备相当数量的可交换离子或带电基团，这些离子或基团的类型决定了离子交换剂的类型，而基团的总数和它们的亲和性决定树脂的交换容量。

(二) 总交换量

总交换量是指交换剂中可交换离子数，一般用单位重量（干树脂）或单位容积（湿树脂）交换剂所能交换的毫克当量离子来表示，即毫克当量/克或毫克当量/毫升。总交换量为离子交换树脂的特性，与操作条件无关。这两种表示法之间的关系式如下：

$$Q_v = \frac{V_t - V_0}{V_t} \cdot \frac{100 - W}{W} \cdot \rho \cdot Q_w$$

Q_v 和 Q_w 各为体积和重量表示的总交换量； V_t 为总床体积； V_0 为外水体积； W 是树脂含水量的百分数； ρ 是树脂的湿密度。

以上的方法仅适用于一些能穿透树脂网孔进入树脂内部的小离子，而对于一些大分子的多电解质则有很大的区别，取决于它们穿透进入树脂的能力。

在实验条件下所得到实际交换量称为“有效交换量”，其大小取决于活性基团的亲和力，洗脱剂的浓度，离子强度，反离子性质及活性基团的选择性。

(三) 交联度

合成树脂时所用的交联剂（如二乙烯苯）在原料总重量中所占的百分比叫做树脂的交联度。交联度也是离子交换剂的一个重要参数，交联度的大小与树脂的膨胀性及交换量均有关系，交联度越大，树脂的网孔越小，膨胀性小，故交换量也少；反之，交联度越小，网孔越大，孔内活性基团越多，故交换量也越大，但膨胀性增大，从而易引起树脂的机械变形破損。

交联度的表示方法是在树脂型号后面标明共聚物中所加交联剂的比例，如Dowex 1

$\times 2$ 表明为 Dowex 阴离子交换树脂 1 号, 其交换度为 2%, Amberlite IR-120 (10%) 表明其交换度为 10%。而国产树脂的编号规定如下:

强酸: 1—100 弱酸: 101—200

强碱: 200—300 弱碱: 301—400

磷酸: 401—500

如 201 \times 7 表明为强碱性阴树脂, 交联度为 7%。有些单位仍沿用原有名称, 如 732 (1 \times 7) 其中 1 为强酸编号, 7 为交联度。

(四) 离子交换剂中活性基的性质

所用离子交换剂的性质决定于它们功能基的性质。阳离子交换剂的活性基有强酸基

($-SO_3^-$) 或弱酸基 ($-COO^-$) 及中强酸基 ($-PO_4H^=$), 而阴离子交换剂的活性基团有强碱基 ($\cdot N^+R_3$) 或弱碱基 ($\cdot N^+HR_2$) 等, 它们的滴定曲线见图 4-2。

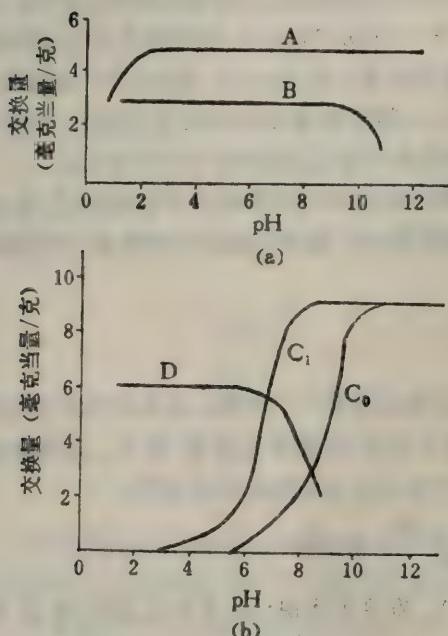


图 4-2 离子交换树脂的滴定曲线

图 4-2a 中曲线 A 是聚苯乙烯磺酸型阳离子交换树脂的滴定曲线。在 pH 2 以上, 磺酸基完全离解, 树脂有最大的交换量, 曲线 B 为强碱型聚苯乙烯阴离子交换树脂的滴定曲线, 带有季胺交换基, 在 pH 10 以下碱性基团解离, 树脂有最大的交换量。

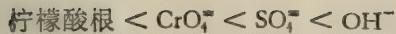
图 4-2 中曲线 C₀ 和 C₁ 表示一个弱酸性羧基阳离子交换树脂的滴定曲线, 与强酸或强碱性的树脂相反, 曲线的形状明显地受介质的离子强度所影响。曲线 C₀ 是在水中, C₁ 是在 0.1 M NaCl 中。从曲线中可看到, 交换量随 pH 的变化而改变很大, 曲线 D 为弱碱性阴离子交换树脂的滴定曲线, 在 pH 5 以下完全离解。

(五) 离子交换树脂对离子的亲和力

溶液中某一离子能否与交联剂上的离子进行交换主要取决于离子的相对浓度 (质量作用) 与交换树脂对离子的相对亲和力。一般说来, 电性越强, 越易交换, 对于阳离子树脂, 在常温常压的低浓度溶液中, 交换量随交换离子的电价增大而增大, 如 $Na^+ < Ca^{++} < Al^{+++} < Ti^{++++}$ 。如原子价数相同, 则交换量随交换离子的原子序数的增加而增大, $Li^+ < Na^+ < K^+ < Pb^{++} < S^{++}$ 。阴离子也有一定的规律, 在常温常压下低浓度溶液中, 强碱性交换树脂的各负电性基团的离子亲和力次序如下: $CH_3COO^- < F^- < OH^- < HCOO^- < Cl^- < SCN^- < Br^- < CrO_4^- < NO_3^- < I^- < C_2O_4^{2-} < SO_4^{2-} <$ 柠檬酸根。

弱碱性阴离子交换树脂对 OH^- 有极高亲和力, 对各负性基的亲和力次序如下:

$F^- < Cl^- < Br^- = I^- = CH_3COO^- < MoO_4^- < PO_4^{3-} < AsO_4^{3-} < NO_3^- <$ 酒石酸根 <



三、离子交换的动力学

在溶液中的盐 (B^+S^-) 中的阳离子 B^+ 与一个完全解离的树脂盐 (A^+R^-) 上的阳离子 A^+ 发生交换的过程可分为以下五个阶段：

- (1) 离子 B^+ 扩散到交换树脂的表面。
- (2) 离子 B^+ 通过树脂孔中的液体扩散到颗粒网孔内可能交换的位置上。
- (3) 离子 B^+ 与 A^+ 进行离子交换，这个过程是一个平衡的过程。
- (4) 离子 A^+ 通过树脂孔的液体扩散到树脂的表面。
- (5) 离子 A^+ 最后扩散到外部溶液中。

以上 1、2、4、5 阶段的动力是渗透作用，它们服从 Fick 的扩散定律。阶段 3 为树脂盐 (A^+R^-) 和 (B^+R^-) 之间的化学电位的差别所决定。

Boyd 等^[5]对整个交换过程作了理论上的分析，假定离子 B^+ 进入树脂的量很小，故离子 A^- 的浓度不变，可以用放射性示踪离子 B^+ 来进行实验。Reichenberg^[6]更进一步扩充了这个理论，假定有相当量的离子 B^+ 进入树脂相中。Boyd 及后来的研究者都认为^[6]，对于小的无机离子，交换过程 3 不是决定交换速率的阶段，因为假如 B^+ 与 A^+ 的交换是决定整个交换过程的速率，那么 A^+ 应与树脂的颗粒大小无关，但事实上在所有的动力学研究中都表明并非如此。

Boyd 等把交换过程 1 和 5 称为外扩散或膜扩散，过程 2 和 4 称颗粒扩散或外扩散。并推导出膜扩散或颗粒扩散的交换动力学公式，指出其交换速率的控制过程可以从时间——百分交换量的曲线形状推导出来。

$$T = \frac{\pi^2}{3} \cdot \frac{D_s}{D_m} \cdot \frac{\delta_\alpha}{r}$$

D_s 和 D_m 是溶质在内和外液相中的扩散系数， α 是分配系数， r 是颗粒半径， δ 是在离子交换树脂周围固定相液膜的厚度。

T 值比 1 小时说明颗粒扩散为交换过程速率的主要控制过程，而 T 值比 1 大则表示膜扩散过程占主要。

从上式中也明显地看到，在 D_s 值（高交联度、紧密的交联剂结构），低 α 值（低交换量）和低 δ （低流速，因 δ 与线性流速成反比）如有利于颗粒扩散，相反对于松散的交联剂结构高 α 值、低流速、颗粒小（这些条件通常认为有助于提高色谱效率）的情况下，则有利于膜扩散。

虽然在离子交换树脂中，扩散系数 D_s/D_m 的比率通常较小（0.01—0.1），但交换速率仍为颗粒扩散所控制，用多糖离子交换剂色谱时， D_s/D_m 较大（0.1—1.0），所以通常用于高分辨率的色谱，其交换速率主要为膜扩散所控制。

膜扩散控制的交换过程的速率通常比颗粒扩散慢 10~100 倍，大分子溶质在两相的扩散系数都较小，例如在多糖离子交换剂上的大分子色谱，其离子交换速率较慢，这一点也支持了膜扩散控制的主张。

四、离子交换剂的选择

(一) 选择交换剂时要考虑下列的一些因素

被分离物质带何种电荷；分子的大小；被分离物质所处的环境，环境中是否有其他离子的存在；这些离子的电性，数量如何；被分离物的物理化学性质，是否耐酸、碱、高温等；被分离物质的大概数量等。

在阳离子交换剂中以磺酸型应用最广，它在酸及中性溶液中均可使用，简单及复杂的无机及有机离子都可交换，但带正电荷的胶体和高分子的阳离子则不能被交换或交换很少。对于一些两性化合物，如分子较小的氨基酸也可进行交换。含有苯酚的磺酸型树脂不宜在碱性溶液中应用。羧酸型的阳离子交换剂较有选择性，可用于强碱与弱碱分离，也可用于碱性氨基酸与其他氨基酸的分离，此类交换剂对氢离子有特大的亲和力，少量的酸就可把碱置换掉，故再生手续简便。

阴离子交换剂与阳离子交换剂相似，强碱型树脂应用范围广，在酸性溶液中强碱型与弱碱型均可使用，但弱酸与碳酸、硼酸、硅酸等不能与弱碱型树脂产生交换作用，必需用强碱型树脂才可除去。在中性溶液中，以用强碱型或中强碱型树脂为宜，而在碱性溶液中则只有强碱型树脂才适用。

(二) 交换剂的处理及转型

商品的树脂是干树脂，使用前要用水浸透使之充分吸水膨胀，又因含有一些水不溶性的杂质，故要用酸、碱处理除去。步骤如下：干树脂用水浸泡2小时后减压抽去气泡，倾去水，用无离子水洗至澄清，倾去水后加入4倍树脂量的2N HCl，搅拌四小时，除去酸液，水洗至中性，再加4倍量2N NaOH，搅拌4小时，除去碱液，水洗至中性备用。

根据需要用适当的试剂，使树脂成为所需要的型式（称为转型），阳离子交换树脂用HCl处理则转为H⁺型，用NaOH处理则为Na⁺型，用NH₄OH处理为NH₄⁺型；阴离子交换树脂用HCl处理则转为Cl⁻型，用NaOH或NH₄OH处理为-OH⁻型，用甲酸铵处理为甲酸型。

树脂长期使用后，如杂质含量太高，则可在酸碱处理前用沸水处理，或用热酸与热碱处理，甚至用有机溶剂（如乙醇、丙酮等）处理，再用水洗干净。

树脂保存时以盐型较稳定。用过的树脂一定要洗干净，防止发霉。如短期存放，可保存于1N NaOH（阳树脂）或1N HCl（阴树脂）中。

(三) 装柱及加样

实验室的离子交换柱一般用玻璃或有机玻璃制成，下部有缩口，管底部烧接上3号砂芯滤板或垫上玻璃纤维，下口带有调节活塞（如图4-3）。柱的大小视需要而定，可根据被交换物质的数量和交换剂的总交换量来决定。工厂也有用离子交换罐的（如图4-4）。一般用塑料或不锈钢为材料，在罐中有分布液体用的交换器及支持树脂的筛板，为了便于反冲，罐的上部需留有足够的空间，为防止酸碱的腐蚀，罐用涂料保护的钢板，或用耐酸碱的塑料制成。

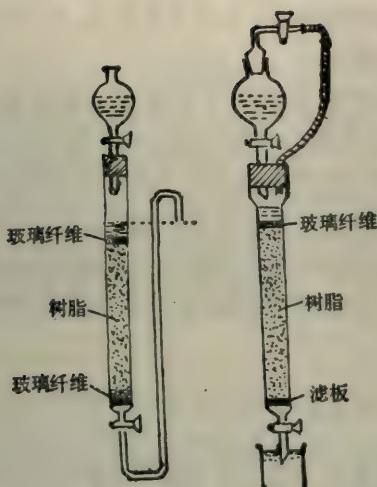


图 4-3 离子交换色谱装置

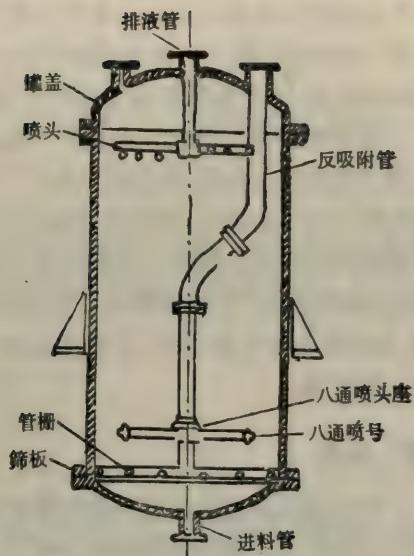


图 4-4 离子交换罐

离子交换剂的装柱与一般柱色谱法相同，主要是防止出现气泡和分层，装填要均匀。防止产生气泡和分层的方法是装柱时柱内先保持一定高度的水（一般为柱高的 $1/3$ ），加入树脂时使树脂借水的浮力慢慢自然沉降。

装柱完毕后，用水或缓冲液平衡到所需的条件，如特定的 pH 值、离子强度等，即可上样品液。上柱中的一个重要问题是控制流速的加压或减压装置，尤其是采用细长柱或细目的交换剂。外加可用减压法，也可用加压法，前者是在柱的排出口增设抽气装置（工业生产上多用此法）；后者是用打气入柱的方法进行加压的（见图 4-5），这是最简单的装置，用一个装

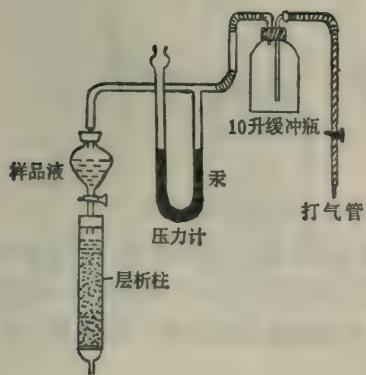


图 4-5 简便加压装置

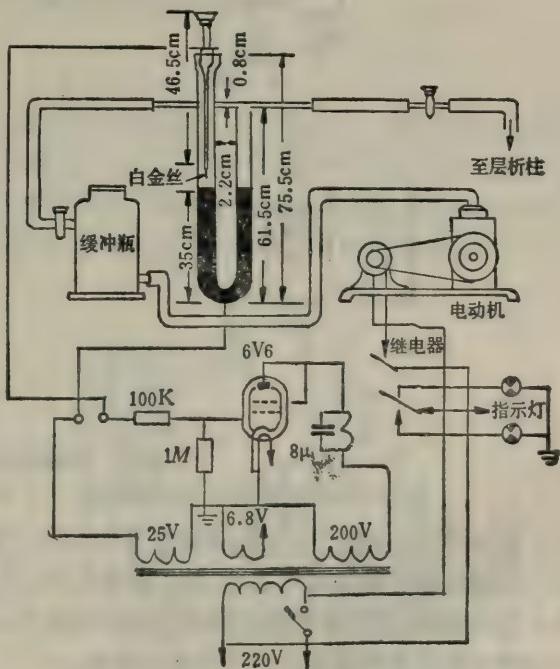


图 4-6 自动加压装置

有样品液的分液漏斗与柱用橡皮塞连接，分液漏斗上端串有压力计并经缓冲瓶与打气管相连，当达到所需压力时就将打气管夹紧，假如树脂为100目，柱高7.2厘米，柱内径1.2厘米时采用30厘米汞柱压力就可达到2毫升/分的流速。

国内有的实验室采用自己设计制造的自动加压装置，如图4-6所示，操作时首先移动压力计左侧的白金丝，使它的尖端处于所需要的压力位置上，插入电源，马达即起动，压缩空气很快进入色谱柱，同时压迫压力计中水银柱，使压力计左侧水银上升，当水银受压上升接触到白金丝尖端时，因白金丝与继电器相连而使空气压缩机马达断路。经过一定时间后，因色谱柱中液体的流动，外压逐渐下降，压力计中水银柱也随之下降而与白金丝脱离，此时继电器恢复原状，马达又起动。由此周而复始，保持色谱柱中稳定的压力，即得到恒定的流速。

(四) 洗脱

对分离不同的物质所用的洗脱液也不同，原则是用一种更活泼的离子把交换上的物质再交换出来。常用的洗脱剂为酸类、碱类或盐类的溶液，改变整个系统的酸碱度和离子强度，以使交换物质的交换性能发生变化，已交换上去的物质就逐渐洗脱下来。为了提高分辨率，常采用梯度洗脱法，装置上有如下三种设计（图4-7）。

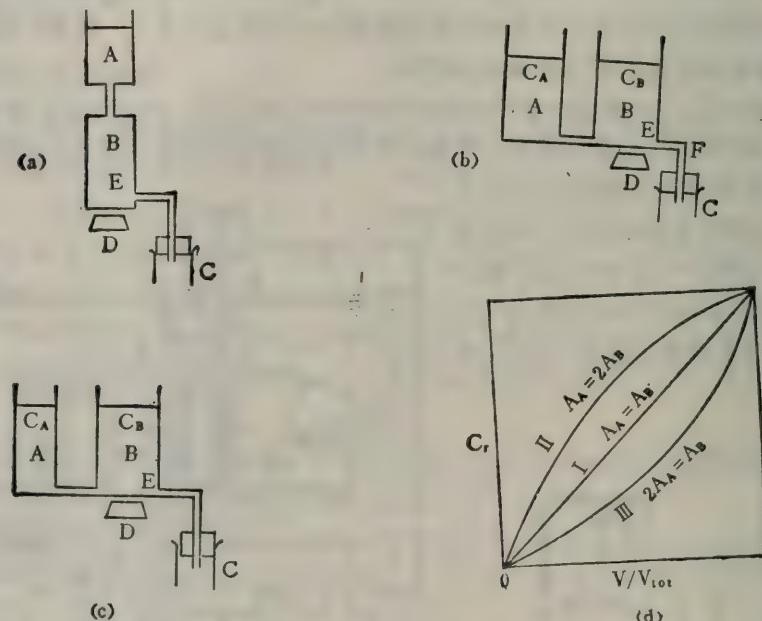


图4-7 梯度洗脱装置

(a) 凸形梯度装置 (b) 线性梯度装置 (c) 非线性梯度装置 (d) 浓度梯度曲线

图4-7(a)包括一个洗脱液储存器A和混合室B相连，混合室又与柱连接，混合室中装入色谱分离开始使用的溶剂，储存器A包括的洗脱液用以增加流动相的洗脱能力，液流从B流入柱中，而洗脱液将以同样流速从A到B，所以在B中液体体积不变。洗脱液和溶剂的混合设置有电磁搅拌E以使混合均匀。

这种装置产生一个凸形指数梯度，以下式表示：

$$C_v = C_A - (C_A - C_B) \cdot e^{-\frac{V}{V_B}}$$

C_v 是体积 V 后洗脱液的浓度, C_A 是储存器 A 中的浓度, C_B 是开始在混合室 B 中洗脱液的浓度, V_B 是在 B 中液体体积。

这种装置现已很少应用。

图 4-7 (b) 包括两个同一横截面积的容器 A 和 B, 连接在一起, 故两者的液面保持一致, 在 B 室中有电磁搅拌以保证混合均匀, 管 F 把层析柱 C 和 B 室连接起来。在流出体积 V 后 B 室中洗脱液的浓度 C_v 可由下式计算:

$$C_v = C_B + (C_A + C_B) \cdot \frac{V}{V_{tot}}$$

C_A 和 C_B 各为容器 A 和 B 中溶液的浓度。

V_{tot} 为开始在两个容器中液体总体积。

图 4-7 (c) 表示容器 A 和 B 不需要相同的横截面, 洗出体积 V 后洗脱液的浓度计算如下:

$$C_v = C_A - (C_A - C_B) \left(1 - \frac{V}{V_{tot}}\right)^{\frac{A_A}{A_B}}$$

A_A 和 A_B 各为容器 A 和 B 的横截面积, 其他符号同上。

图 4-7 (d) 表示浓度梯度曲线, 当 $A_A = A_B$ 时为线性梯度, $A_A > A_B$ 时为凸形梯度, $A_A < A_B$ 时为凹形梯度。

五、离子交换色谱法的应用

(一) 氨基酸

离子交换树脂用于氨基酸的系统分离研究工作已有几十年的历史, 但早期的工作效果不大满意, 特别是对碱性氨基酸回收率很差。自从 Moore 和 Stein^[10] 引进了两根层析柱分离氨基酸的方法之后, 在氨基酸系统分离方面有了很大的发展。方法是在 Dowex 50 × 8 的 100 厘米层析柱上分离酸性和中性氨基酸, 开始洗脱液为 pH 3.41 的柠檬酸钠(37.5°C),

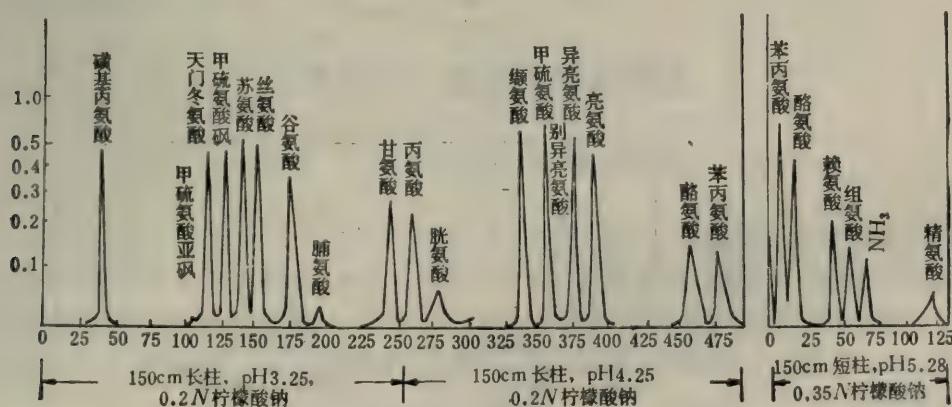


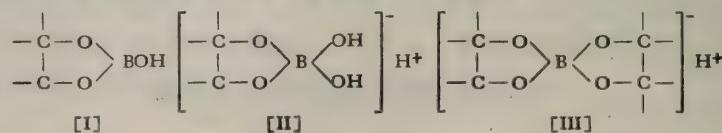
图 4-8 氨基酸自动色谱仪对各种氨基酸分离结果

最后洗脱液为 pH 4.25 的柠檬酸钠 (50°C); 用 15 厘米的 Dowex 50 × 8 层析柱, 以磷酸和柠檬酸缓冲液 (pH 6.8 和 6.5) 洗脱分离色氨酸和碱性氨基酸及游离氨。

到 1958 年, 以上的手工分离方法被氨基酸自动色谱仪所代替, Moore 等^[11] 用粉状树脂 Amberlite IR-120 (400—600 目), 150 × 0.9 厘米层析柱以分离中性和酸性氨基酸, 整个操作过程在 50°C 下进行, 仅用一种缓冲液, 从 0.2 M 柠檬酸钠 (pH 3.25) 到 0.2 M 柠檬酸钠 (pH 4.25), 而碱性氨基酸的分离则在 15 × 0.9 厘米的短柱上用同样树脂进行, 以 0.3 M 柠檬酸缓冲液 (pH 5.28) 在 50°C 下洗脱, 其分离结果如图 4-8。

(二) 糖

离子交换色谱法也可用于中性不带电荷的糖类的分离。主要原理是利用糖和硼酸盐生成的糖-硼酸盐复合物有离子性质, 从而可用离子交换色谱法分离。某些多羟基化合物 (包括糖) 在碱性溶液中和硼酸盐离子反应生成稳定的复合物, 可包括以下三种形式:



[I] 型实际上是非离子化的形式, 而 [II] 和 [III] 型在碱性溶液中是完全离子化的, 为中等强度的酸。这些化合物的形成由以下因素决定: 糖的绝对浓度, 硼酸盐的离子浓度, 两者的比率。在低糖浓度和低的糖/硼酸盐的比率下, 主要产生 [II] 型复合物。

Khym 和 Zill^[12] 用强碱型阴离子交换树脂 Dowex-1 层析分离果糖、半乳糖和葡萄糖的混合物, 用 0.016M K₂B₄O₇ 洗脱果糖和半乳糖, 以 0.3 M K₂B₄O₇ 洗脱葡萄糖。这个方法也可用于寡糖和六元醇的分离^[11], 如山梨糖醇、半乳糖醇和甘露糖醇可在 Dowex-1 硼酸柱上用 K₂B₄O₇ 溶液洗脱, 其中甘露糖醇由于它的一对顺式二烯基而在柱上产生强烈的滞留。

对单糖和低聚糖的分离如采用硼酸盐复合物阴离子交换体系, 虽然具有较高的分辨率, 但由于流速慢, 溶质要暴露在碱性条件中的缺点, 不如采用分配色谱为佳。

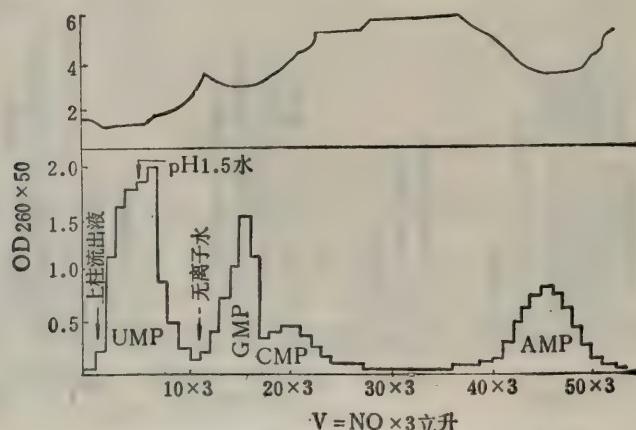


图 4-9 阳离子交换柱分离四种单核苷酸曲线及 pH 值变化曲线

(三) 四种 5'-单核苷酸的分离^[13]

在 pH 1.5 时, AMP、CMP、GMP 上的氨基离解, 带正电荷可被阳离子交换树脂所吸附。UMP 没有氨基, 不带正电荷, 大部分直接流下来。当用无离子水洗脱时, 随着 pH 值的变化, GMP, CMP, AMP 上的氨基解离度降低的程度不同, 而先后失去阳离子交换树脂上的吸着能力, 按 GMP、CMP、AMP 的顺序依次洗脱下来。结果如图 4-9。

树脂: 聚苯乙烯-二乙烯苯磺酸型, 200~300 目, 1×8。柱: 10×58 厘米。上柱量: 占树脂全交换量 1.7%

(四) Dowex-1 甲酸型树脂柱分离腺苷, AMP、ADP 和 ATP

分离条件如下: 树脂: Dowex-1 甲酸盐。柱: 1×30 厘米。样品量: 每毫升含腺苷 AMP、ADP 和 ATP 各 10 毫克, 调 pH 至 7.9。

以 10-5N 甲酸线性梯度洗脱

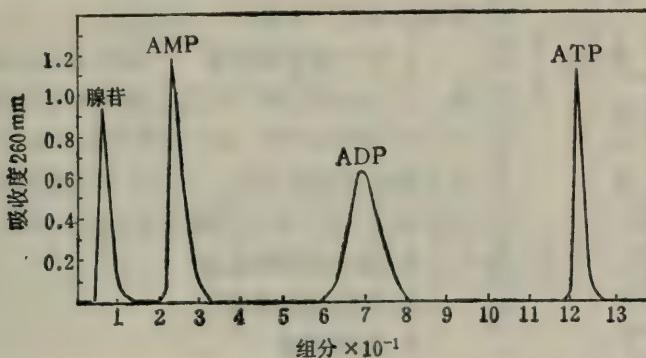


图 4-10 在 Dowex-1 甲酸盐树脂柱上腺苷、AMP、ADP 和 ATP 的分离图谱^[14]

(五) 图 4-11 为人血红蛋白的氨基乙酰化 β 链的胰蛋白酶水解物的色谱分离^[15]

实验条件如下: 柱 0.9×18 厘米。树脂: 磷化阳离子交换树脂 Spinco 15A, 在 50°C 下以线性梯度洗脱(混合室: 250 毫升 0.2 M 吡啶醋酸缓冲液 pH 3.1; 贮存室: 250 毫升 2.0M 吡啶醋酸缓冲液, pH 5) 流速: 300 毫升/小时。

第三节 高效液相色谱法

一、引言

高效液相色谱(简称 HPLC) 是最近十多年兴起来的一门新技术, 它最主要的特点是流动相在高压泵作用下高速地能准确控制流量地通过色谱柱。使样品中各组分在流动相和固定相之间迅速地达到平衡; 其次采用了封闭的能重复使用的柱子并特殊制作了各种类型固定相, 这些固定相不仅具备体积小、均匀而且有耐压和传质快等特点, 使色谱分离效率大大提高, 一般定量分析可达 $\pm 1\%$ 准确度。用于制备色谱时又可以连续操作。每次制备样品量最高可达克量级。高效液相色谱不同于气相色谱是对分离的样品类型具有

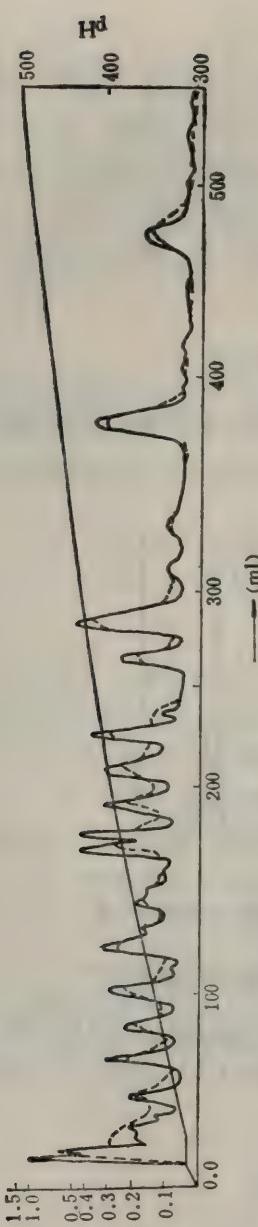


图 4-11 人血红蛋白的氨基乙酰 β 链 (100 mg) 的胰凝乳蛋白酶水解物的制备色谱图

非常广泛适应性，样品还可以回收。从各种无机化合物、有机化合物到具有生理活性的各种生物大分子；极性的和非极性的都适用，此外整个仪器装置自动化程度很高，附加的各种检测器种类繁多，因此，高效液相色谱已成为现代化学和生物化学分析和制备最有力武器之一。在生化领域中广泛应用于下列产物的分离和鉴定：(1) 氨基酸及其衍生物；(2) 有机酸；(3) 酯类化合物；(4) 生物碱；(5) 抗菌素；(6) 糖类；(7) 吲哚；(8) 核酸及其降解产物；(9) 蛋白质、酶和多肽；(10) 脂类等。

高效液相色谱的分离原理与经典色谱相同，主要是各种溶质在色谱柱中差速迁移的结果。这种差速迁移现象，是样品在固定相和流动相之间分配不同所引起的，所以按照固定相对样品的保留作用机理不同，高效液相色谱常分为以下几类：

1. 液—液分配色谱 又可分为正相色谱和反相色谱。正相色谱以极性较强的填料作固定相，而以极性较小的溶剂作流动相，极性较强的化合物被保留，极性弱的化合物先被洗脱下来。反相色谱则固定相极性小，流动相极性大，用于分离非极性或弱极性物质。

2. 液—固吸附色谱

3. 离子交换色谱

4. 凝胶色谱

此外最近正出现高效聚焦色谱和蛋白质快速液相色谱 (FPLC) 等主要是高效离子交换剂和琼脂糖凝胶等色谱用于蛋白质、多肽、酶的发展。

二、高效液相色谱仪概述

高效液相色谱仪主要由高压泵、色谱柱、检测器三大部分组成。附件可增设自动记录仪、洗脱液自动部分收集器、贮液器及梯度混合装置、进样阀或注射器等。色谱

柱是获得良好分离率的核心部件，但好的色谱柱必须配备优良的整机装置，才能获得满意的结果。图 4-1 是高效液相色谱仪器装置示意图。现按仪器各个部分作一简单介绍：

1. 溶剂槽(或称流动相贮罐) 商品贮罐是用不锈钢制成，常附加脱气设备如搅拌、加热、抽真空和吹氮等。自制简单溶剂槽可用玻璃瓶代替。

2. 溶剂程序控制器 主要用于梯度洗脱，梯度的形成可分常压混合和高压混合两类。前者是在常压下将溶剂混合再用单泵输送给色谱柱。后者是不同溶剂用双泵在高压条件下混合，自动化程度较高，可在较大范围的流速 (600 毫升—3 升/小时) 和较长时间范围内 (15 分钟至 16 天) 获得梯度。

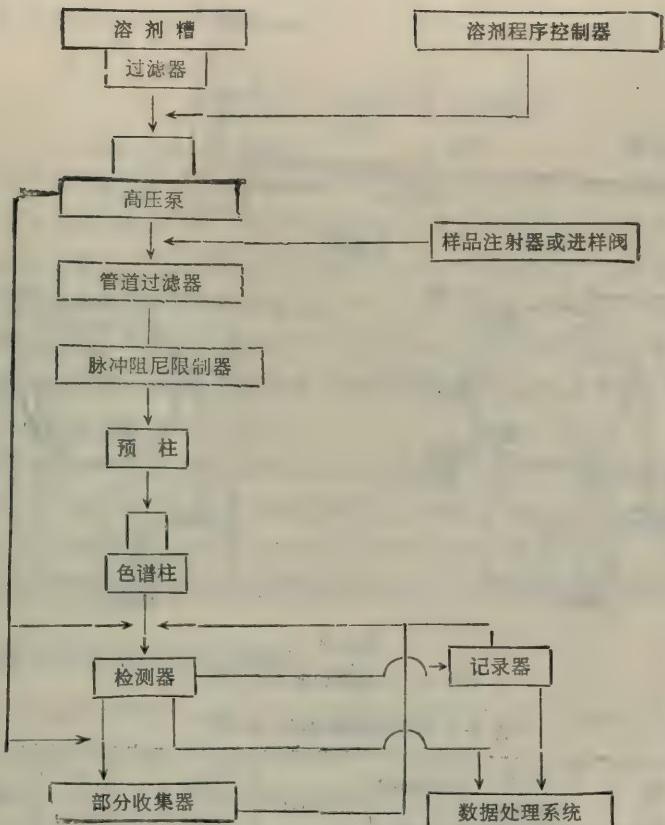


图 4-12 高效液相色谱仪装置示意图

3. 高压泵 是高效液相色谱主要部件之一，可用优质不锈钢或陶瓷制成。有较强抗化学侵蚀性和抗机械破损性能。输出压力最高达 350 至 400 巴(约为 5—6 千磅/英寸²)。常分机械泵和气动泵两大类，使用时各有优缺点，对于制备色谱来说，一般要求泵压没有分析色谱高。但希望有较大流量。一个好的泵应该是工作压力范围大，没有输液脉冲或者很小的输液脉冲(脉冲对荧光、紫外检测影响较小，对化学检测影响较大，有时需加脉冲阻尼限制器以减弱之)。

4. 进样装置 最简单的方法是使用注射器，注射器进样隔膜的设计应能承受高压，多用硅酮弹性体或氯丁橡胶制成。另一种是进样阀，能在高压下操作而无扰流，宜于大体积样品的注入，注射器和进样阀见图 4-13。

5. 检测器 检测器是高效液相色谱仪的眼睛，必须具有足够灵敏度，而且要求适应条件范围比较广些，最常用的检测器有：

(1) 紫外吸收光度计：凡是有紫外吸收的化合物都可以使用。使用最多的波长有 280 毫微米，260 毫微米(蛋白质类)，254(核酸类)，210，206 毫微米等。有一个以上的双键生色团的化合物都能产生紫外吸收。有些蛋白质如 r-球蛋白在 206 毫微米比在 280 毫微米的吸收度大 40 倍。故选择波长范围时还需依不同化合物具体情况而定。

(2) 示差折光计：也是应用较广的检测器之一。多应用于脂质、糖类物质渗色的测定。在适当的条件下能检测到 3 微克/毫升的样品量，缺点是对温度比较敏感。

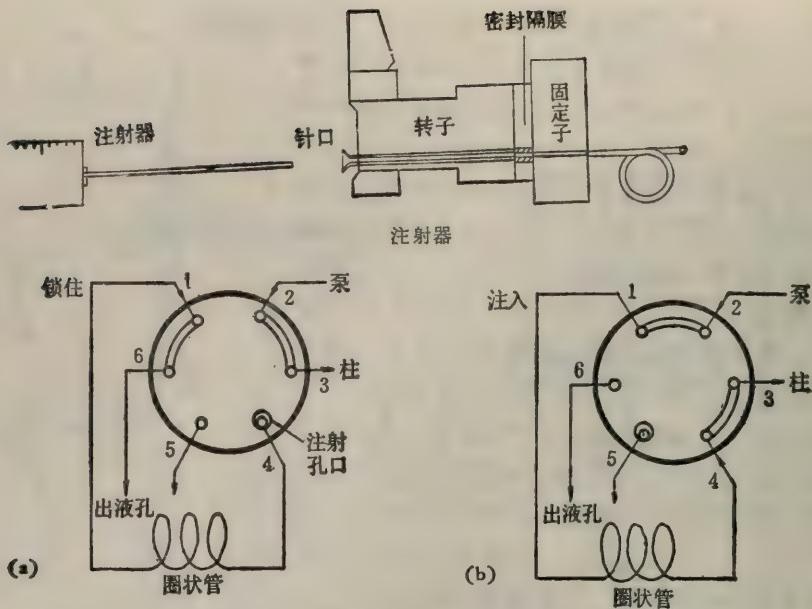


图 4-13 注射器和进样阀简图

表 4-4 各种检测器性能一览表^[1]

参数	紫外 (吸收值)	折光 (折光指 数单位)	溶质迁移* (安培)	放射性	极谱 (微安)	红外 (吸收值)	荧光	电导(微欧)
用于梯度洗脱	选择性	普通	普通	选择性	选择性	选择性	选择性	选择性
线性动态范围上限	可.	不可	可	可	未定	可	可	不可
线性范围	2.56	10^{-3}	10^{-8}	无现成数据	2×10^{-5}	1.5	无现成数据	1000
在±1% 噪音下满刻度灵敏度	5×10^4	10^4	~105	大	10^4	10^4	~ 10^3	2×10^4
在±1% 噪音下满刻度灵敏度	0.05	10^{-3}	10^{-11}	无现成数据	2×10^{-6}	0.01	0.005	0.05
对合适样品灵敏度	5×10^{-10} 克/毫升	5×10^7 克/毫升	10^{-8} 克/秒 (约 5×10^{-7} 克/毫升)	50 居里/ 毫升	10^{-10} 克/毫升	10^{-6} 克/毫升	$10^{-9} \sim 10^{-10}$ 克/毫升	10^{-8} 克/毫升
对流速敏感性	无	无	有	无	有	无	无	有
对温度敏感性	低	10^{-4}°C	可忽略	可忽略	$1.5\%/\text{ }^\circ\text{C}$	低	低	$2\%/\text{ }^\circ\text{C}$

* 也称火焰离子化检测器

(3) 放射性检测器：主要利用色谱柱中流出含有放射性标记的溶质与检测器中闪烁体接触时产生脉冲而被检出。多用于代谢途径中间产物的分离。

(4) 荧光检测器：也是一种受干扰小，灵敏度很高的测验方法。只要能在紫外光激发下能发射出荧光的溶质都可以使用。灵敏度可达 $10^{-9} \sim 10^{-10}$ 克/毫升。适用于各种氨基酸、胺类维生素、甾醇化合物的测定。

此外，还有溶质迁移检测器或称火焰离子化检测器，极谱检测器，电导检测器等。溶质迁移检测器对样品有一定破坏性，制备分离中比较少用，由于制备色谱、溶质的浓度一般都比较大，对检测器灵敏度的要求没有分析色谱那样严格，在高效液相色谱中，一些常

用的检测器有关规格性能见表 4-4。

三、高效液相色谱的固定相填料

经典液相色谱所用的多孔物质如硅胶、氧化铝、离子交换珠等，由于粒度大，传质慢而不均匀，造成谱带扩散严重，影响了柱的分离效率。针对上述缺点，高效液相色谱所用的固定相填料大部分具有实心圆核外裹多孔薄层构成，使溶质在多孔薄层中易于出入。另一种是形状规则的全多孔微粒（直径一般在 5—10 μm 左右），这样小的颗粒，溶质在孔中移动的距离是很短的，以上结构都使溶质易于在二相之间达到平衡，加快分离速度和提高分离效率。形状规则的填料及均匀装填都使样品分离获得良好重现性。现代高效液相色谱使用的固定相填料常有下列几大类：

1. 按形状可分为球形和无定形两类，圆球形填料有利于分离效率和重现性。

2. 按硬度可分为硬质填料、半硬质填料凝胶及一些如琼脂糖的生物软胶。

3. 按结构可分为表面多孔薄层填料与完全多孔填料两类：

现根据不同色谱的要求，介绍一些常用固定相填料的名称及其主要结构的性质。

（一）液—液分配色谱常用的固定相填料

液—液分配色谱的固定相一般多选表面积小，孔径较大的为填料，全多孔和表层多孔填料都能用于制备液—液分配色谱，主要有：

1. 全多孔硅珠：如商品名 Porail 或 Spherosil。

2. 表层多孔硅胶：如商品名 Zipax 和 Corasil。

3. 化学键合相：是在表面多孔或全多孔的小球上经过化学反应结合上一层固定相。有的在多孔硅珠上用醇类脂化生成脂化硅质填料（刷型）如商品名 Durapak，或经硅烷化生成聚硅氧烷型（涂层型）填料如商品名 Permaphase，以上化合键合相固定相都比较稳定，不易在使用中脱落。

（二）液—固吸附色谱常用的固定相填料

与经典吸附色谱相似，需要选择具有良好表面吸附性能的物质，其中极性吸附剂有硅胶、氧化铝、氧化镁、硅酸镁（Florisil）等。非极性吸附剂有活性炭。如按结构和性质不同又可分为：

1. 全多孔高效吸附剂 如全多孔硅胶（商品 Porasil A-F），全多孔氧化铝（商品 Bio-Red AG）等。

2. 全多孔低效吸附剂 如多孔硅胶（商品 Divason Code 800）。

3. 表面多孔吸附剂 如薄壳型硅胶（商品 Corasil II）及用于制备高容量薄壳型氧化铝（商品 Pellumina HC）。

（三）离子交换色谱常用固定相填料

主要有离子交换树脂制成的微网或大网状结构的全多孔颗粒，或在固体惰性核上涂渍一层多孔离子交换剂而成薄壳结构。离子交换剂的骨架有聚苯乙烯，葡萄糖和纤维素

等。它们都可以带上大量可交换基团。一些以糖基为骨架的离子交换剂适用于分离各种生物大分子物质，使用较多的有：

弱碱性 DEAE Sephadex A25, A50。

强碱性 QAE Sephadex A25, A50。

弱酸性 CM Sephadex C25, C50。

强酸性 SP Sephadex C25, C50。

(四) 凝胶色谱常用固定相填料

用于凝胶色谱的凝胶有：

1. 软胶和半硬胶，如葡聚糖凝胶 (Sephadex) 交联聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-gel-P) 和琼脂糖 (Sepharose) 等，这些凝胶多使用水或缓冲液作流动相，凝胶承受压力较低，一般在 7—14 巴之间，过去由于高效液相色谱高压泵的设计未能满足这一技术要求，在生化中实际应用很少。近年来由于制出了流速低而稳定的低压泵及各种防止缓冲液中金属的腐蚀的装置，生物凝胶类填料才广泛用于 HPLC。

2. 刚性和半刚性凝胶，包括刚性多孔玻璃和多孔硅胶(商品 Bio-glas, Porasil 和 Merck-O-gel-Si 等)；半刚性聚苯乙烯珠 (商品 Poragel, Styragel, Bio-Bead-S) 乙烯乙酸脂珠(商品 Merck-O-gel-OR)，以上刚性和半刚性凝胶一般均可承受 60—70 巴以上压力，并能在有机溶剂中使用。

四、色谱方法的选择

待分离样品对色谱法的选择主要基于样品的物理化学特性及溶解度。对于一个未知样品，首先要大概了解它的分子大小，然后进一步试验其溶解性能。根据分子大小和溶解性能便又粗略地选定一种色谱柱进行初分。一般来说，吸附色谱多适用于非极性样品，它的柱容量主要决定于吸附剂表面积的大小。离子交换色谱和液—液分配色谱多用于水溶性样品，柱容量分别决定于离子交换量和固定相中固定液的体积，凝胶过滤色谱可根据填料的性能不同分别用于亲水和亲脂性样品，但以上选择也不能绝对化，如吸附色谱的填料经过特殊处理后也可以吸附极性很强的水溶性化合物，液—液分配色谱的正相和反相就可分别用于分离极性和非极性化合物。关于对色谱方法的选择，可参考 L.R. 斯奈德 (Snyder) 和 J. J. 柯克兰 (Kirkland) 合著的“现代液相色谱法导论”一书中所提出的图解 (见图 4-14)。另 LKB 和 Beckman 公司根据他们生产的产品也提出了类似选择色谱方法的图解 (见图 4-15, 图 4-16)，均可结合我们具体情况参考选择。

注：离子对分配色谱，是可离子化或离子型的化合物 (在水的介质中) 用一个适当的反离子 (如四烷基铵化物 / 苦味酸) 与离子或可离子化的溶质生成离子对，该离子对便在二相中产生新的分配系数，大大提高柱分离率和选择性，此法用途很广。

五、分离度的调整

液相色谱的分离度 (或称分辨率) 常以下面公式表示：

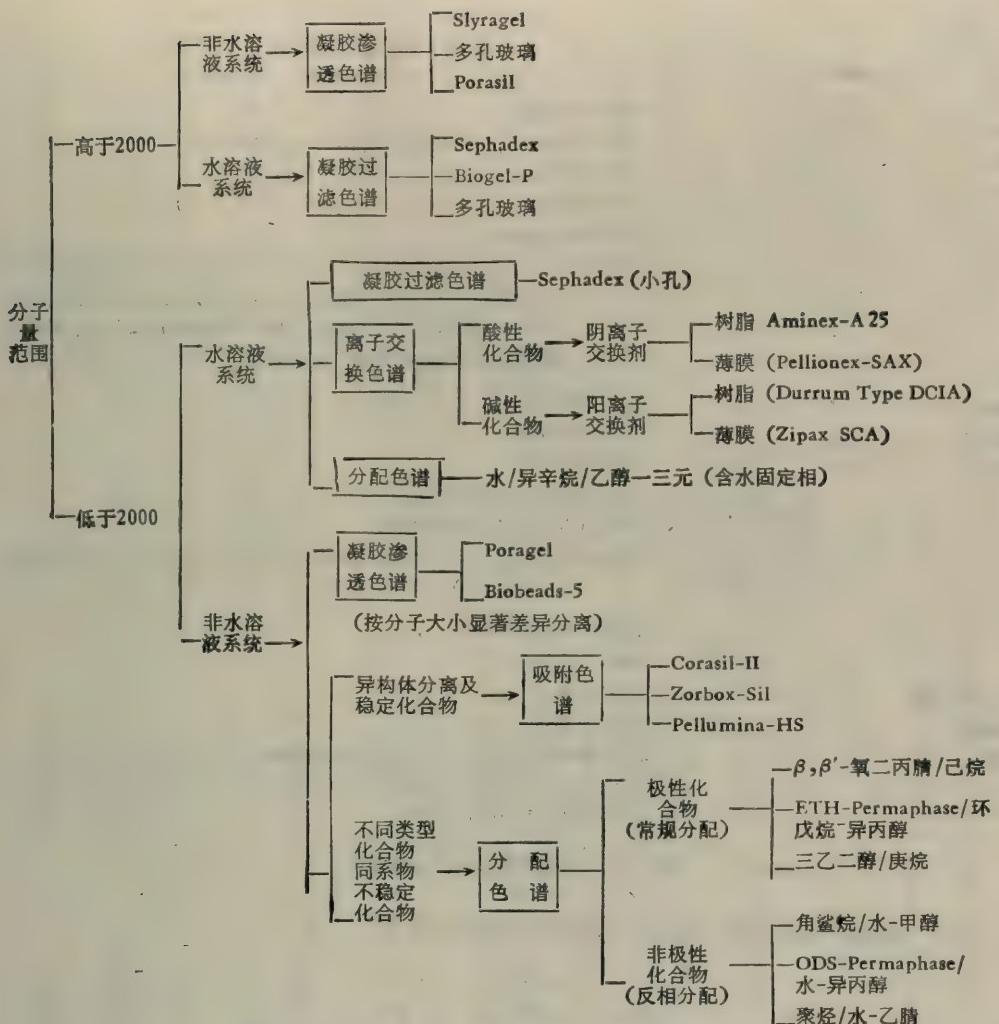


图 4-14 液相色谱方法选择

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \sqrt{N_2} \left(\frac{K'_2}{1 + K'_2} \right)$$

(1) R_s 表示分离度, 也即是在色谱图中二个相邻的峰分离的程度。 R_s 值越大, 表示二峰尖分隔愈远, 二峰的峰宽越窄。分离度也可以在色谱图计算而得, 下面是一个双组分的色谱图:

$$R_s = \frac{\alpha(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$$

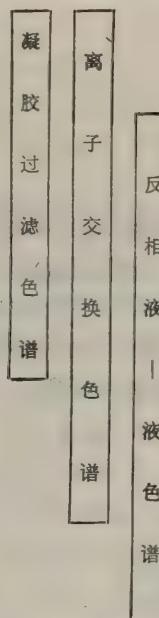
W_1 W_2 表示相邻二个峰的宽窄度, t_{R_1} , t_{R_2} 为相邻二个峰的保留时间。

(2) N 表示理论塔板数。 N 与柱长 (L) 成正比, 与每个理论塔板的高度 (H) 成反比。即 $N = \frac{L}{H}$ H 也是一个色谱柱单位长度的效率的量度, 小的 H 意味着得到高的柱效率, 它受各种因素的影响, 如小的填料颗粒直径, 低的溶剂流速和粘度, 以及提高分离温度均可获得较小的 H 值。

大分子
(蛋白质)
核酸
多糖

碎片
(多肽)
寡核苷酸
寡糖

小分子化合物
(氨基酸)
核苷酸



- 凝胶过滤色谱
2150 HPLC 泵一流速可控制 $10\mu\text{l} \sim 5\text{ml}/\text{min}$ 之内
2154 注射器
2210 记录仪
2158 紫外检测器
制备色谱柱 2135 LKB Ultropac TSK G2,000, 3,000 或 4,000 SW
 $21.5\text{mm} \times 60\text{mm}$ (2135 蓝色柱) 如特异吸附少, 回收率高, 每次
可分离样品最高达 100 毫克, 此柱可在缓冲液和有机溶剂使用,
能经受变性剂及各种去污剂的侵蚀。
- 离子交换色谱
2150 HPLC 泵
2154 注射器
2210 记录器 2158 紫外检测器
11300 UltraGrad 梯度混合器
制备色谱柱: LKB 535/545 CM/DEAE 柱, $21.5 \times 150\text{mm}$ (2133 蓝色
柱)
- 反相液-液色谱
2150 HPLC 泵
2154 注射器
2210 记录器
2158 紫外检测器或 2151 UV/VIS 检测器
2134-210 Lichrosorb RP-18 2134-220 Lichrosorb RP-8
2134-230 Lichrosorb RP-2

图 4-15 LKB 产品色谱方法的选择

(3) α 为选择因子也称分离因子, 是二种物质容量因子之比。

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1}$$

选择因子 (α) 可以通过变更流动相和固定相的组成性质而改变。

(4) K' 为容量因子, 一般可以看作溶质在固定相中的总摩尔数与在流动相中总摩尔之比。对于一定的柱子、溶剂、分离温度和样品浓度足够小时, K' 是一个常数, 容量因子与分配常数关系如下:

$$K' = \frac{\text{固定相中溶质量}}{\text{流动相中溶质量}} = \frac{\text{固定相中溶质浓度}}{\text{流动相中溶质浓度}} \times \frac{\text{固定相体积}}{\text{流动相体积}}$$

$$= \text{分配常数} \times \frac{\text{固定相体积}}{\text{流动相体积}}$$

以上影响分离度的三个因子 α 、 N 、 K' 基本上是独立的, 可以调整好其中一项, 然后再调整另外两项, 不一定三项同时改变。 α 、 N 、 K' 三个因子对 R_s 的影响情况比较复杂, 每一因子的作用都可以作专门的论述。对于二个组份的色谱峰来说, 变动选择因子 α 时, α 使其中一个谱峰发生位移, 而峰高不变。增大理论塔板数 N 时, 可以使二个谱峰同时变窄, 峰尖增高。而变动 K' 时, 对分离度影响较大, 减少 K' 时, 又使谱峰提前呈现, 但分离度减少, 增加 K' 可以提高分离度, 但延长分离时间, 谱带变宽。图 4-18 表示 α 、 N 、

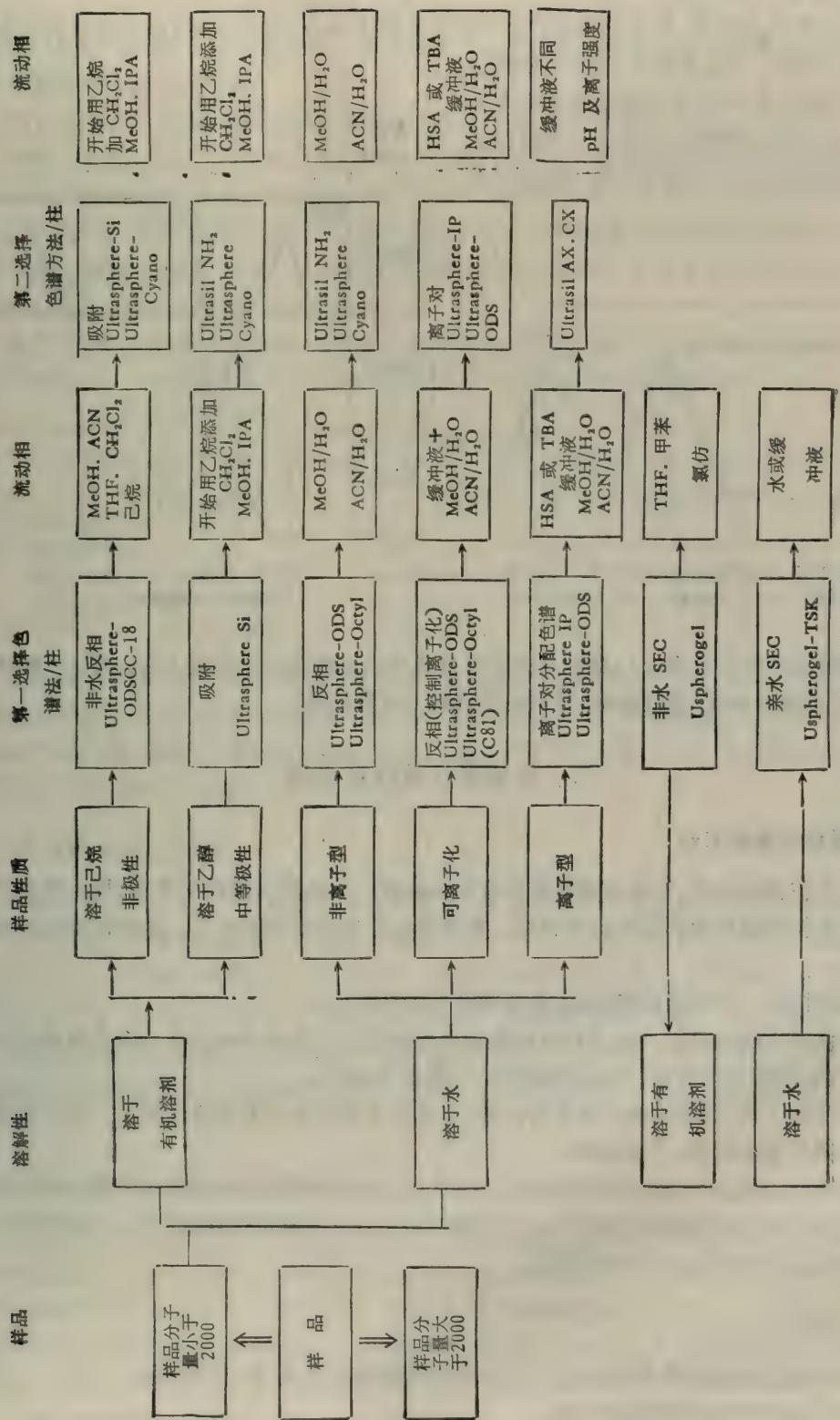


图 4-16 Beckman 产品色谱方法的选择

K' 三个因素对色谱图的影响。

在制备色谱图中，常常在混合组份中要求分离其中一个组份，此组份如在谱图中是一个较大的峰时，可先提高分离度（改变流动相成份）使成为单峰，再使样品的负载增至最大，然后收集谱峰中心部分。如所要求组份在谱图中是一个较小的峰（表示样品

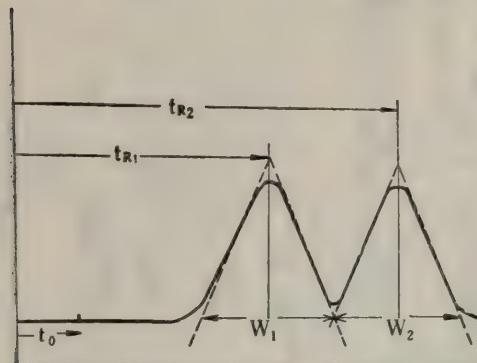


图 4-17 一个双组份色谱图计算 R_s 的方法
保留时—— t_R 分辨率—— R_s 峰宽——W

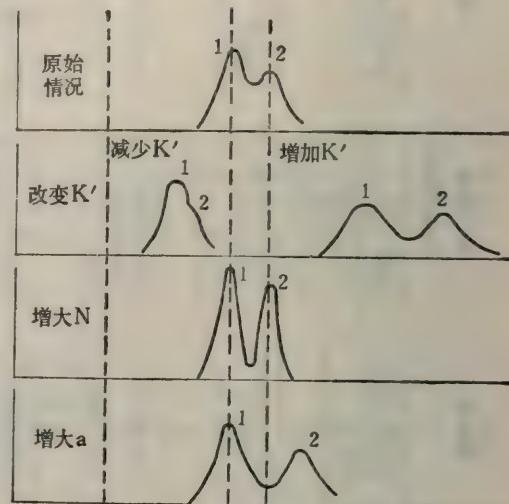


图 4-18 改变 α 、 K' 、 N
对样品色谱图影响

中含所要求组份的量很少），便经过多次分离将此组份收集浓集后再上柱，按第一种情况处理，先提高分离度，使成单峰，然后在超负荷下收集纯品。

六、具体操作及注意事项

（一）进样前准备工作

首先使用的溶剂，即流动相要求具有较高纯度。有机溶剂事前须重蒸；用水要经过混合离子交换树脂处理和活性炭处理后，重蒸除去各种杂质才能使用。盐类常须经过重结晶。

各种溶剂一般要求新鲜配制，使用前经过脱气处理。

挥发性有机溶剂脱气较常用方法是超声波振荡。水和缓冲液先通过微孔薄膜滤去固体微粒后，缓慢加热搅拌（在电磁搅拌器上）抽真空去气。

样品加入前，必须用流动相充分洗柱，待流出液经过检测器的基线校正，证明柱内残留杂质确已全部除净，才能进样。

进样时，样品用与流动相相同的或互溶的溶剂完全溶解，如有悬浮状颗粒，需过滤除去，然后通过注射器或进样阀进样。进样量的多少，视不同的柱容量而定，一般制备性柱每次最大上柱量可达 10—100 毫克。

（二）洗脱

进样后洗脱的条件常按事先计划好的溶剂程序进行，内容一般包括：

（1）每次色谱计划所需时间。

(2) 洗脱液(即流动相)的组份(单元或多元)及对形成梯度的要求。如样品各组份与固定相之间的亲和能力差别较大时,采用梯度洗脱方法(包括极性, pH 和离子强度的改变),可获得较好的分离效果。

(3) 流动相的流速,是恒速或变速或每分段时内要求流动相的流速。

实际上,样品展层以后所得色谱图一次很难获良好的分离效果,需要根据色谱图各组峰形状、位置进行综合分析,并按自己所需制备的组份的谱峰分离情况,调整流动相的极性(或离子强度)梯度组合、流速及展层时间等。以上这些因素一般现代高效液相色谱仪都有自动控制程序装置,再加上检查温度和 pH 对分离的影响,直至选择到最好的分离条件后,便开始大规模分离,收集所需的组份。

各类色谱柱加进样品后如何选择适应的洗脱液(即流动相)其基本原理与经典色谱洗脱法大致相同。例如液一液分配色谱的正相与反相色谱的操作原则大致如表 4-5。

表 4-5 正相与反相色谱操作原则

	正 相	反 相
固定相极性	强	弱
溶剂的极性	弱至中	中至强
样品洗脱程序	弱极性组份先流出	强极性组份先流出
增加溶剂极性的影响	减少洗脱时间	增加洗脱时间

当然高效液相制备色谱对流动相的要求,需照顾到与检测器相匹配,同时还要尽可能获得较大的分离度,因此,使用有机溶剂时要求粘度要低并有一定挥发度。其中最常用的有机溶剂有乙腈、甲醇、二氯甲烷、己烷、硝基丙酮等。有些工厂生产的色谱柱还限定不准使用某种溶剂,则应注意遵守。

(三) 色谱柱的清洗及保存

色谱分离完毕后,应用溶剂彻底清洗色谱柱,或色谱柱用后存放时间过久也应定期清洗。硅胶柱先用甲醇和乙腈冲洗(乙腈价格较贵,可少用,多用甲醇)再用干燥的二氯甲烷清洗后保存,烷基键合相色谱柱可用甲醇—氯仿—甲醇—水顺次交叉冲洗除去有脂溶性及水溶性杂质。离子交换柱可按一般经典方法经过酸碱缓冲液平衡后,再以水和甲醇洗净。凝胶柱则以根据其使用流动相的不同分别以甲苯、四氢呋喃、氯仿或水大量冲洗至净。但亲水性凝胶及其他亲水性色谱柱保存时,常加入少量甲苯或氯仿以防止微生物污染。

(四) 一些生化样品分离色谱图的举例

高效液相色谱的使用,除了认真了解仪器的设计原理和各种色谱柱的性质、应用范围外,要真正掌握好这门技术,还要通过大量实践才能得心应手。目前国内外高效液相色谱仪和色谱柱型号繁多,每个厂家对于自己产品都有比较详细说明和应用举例,只要遵守操作规则及结合有关色谱的原理加以具体运用,在短期内掌握仪器操作开展实验工作是不困难的。下面试举几个生物样品分离色谱图的例子,供读者参考。

1. 标准核苷酸混合液的分离: 使用一种大孔径多孔硅胶高效阴离子交换剂, 分

离各种 5'-核苷磷酸盐，在室温下进行，每次色谱时间约 35 分钟。色谱条件及结果见图 4-19。

2. 数种单糖及双糖的分离^[16] 使用一种极性键合相微粒硅胶，作正相液一液分配色谱，洗脱剂是乙腈：水 (80:20) 出峰顺序与样品的极性相同，极性强最后被洗脱，色谱条件及结果见图 4-20。

3. 人血清蛋白的分离 使用的是一种 KLB 出品的凝胶制备柱，每次可进样品 1.5 毫升血

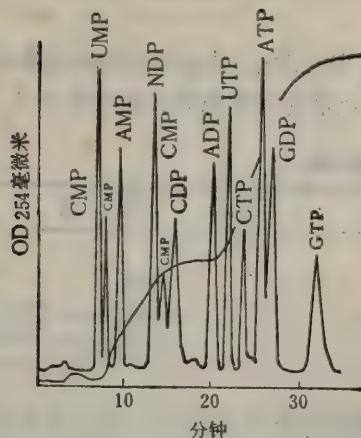


图 4-19 标准核苷酸混合液的分离

样品：12 种 5' 核苷酸混合液

色谱柱：Polyomion Si 阴离子交换柱

洗脱液：磷酸盐缓冲液 0.01 摩尔至 1 摩尔 pH 7.0

流速：0.4 毫升/分

检测：紫外 254 nm

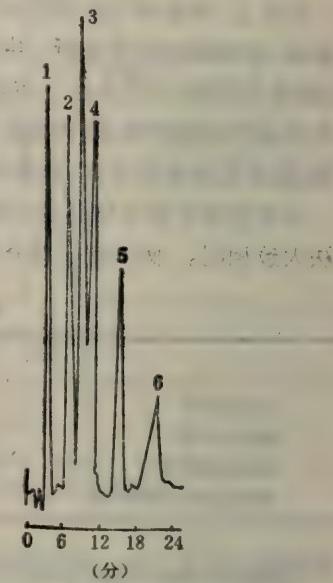


图 4-20 几种单糖及双糖的分离

样品：1. 溶剂，2. 木糖，3. 果糖，4. 葡萄糖，

5. 蔗糖，6. 乳糖

色谱柱：Partisil 1025-PAC 柱 (10μ) 4.6×250 mm

洗脱液：乙腈：水 (80:20) pH 5.0 (H_3PO_4)，流速：

1.3 毫升/分 检测：折光计

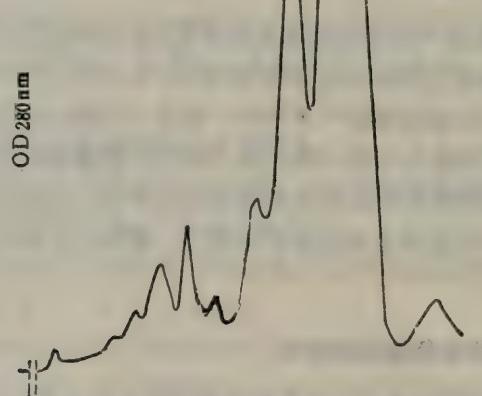


图 4-21 人血清蛋白质分离色谱图

样品：未稀释的人血清 1.5 毫升 色谱柱：LKB Ultropac, TSK G-4000 SWG 2135 蓝色柱 21.5×600 mm；流速：70 微升/分 检测器 UV 280nm

清，回收率可达 90% 以上，色谱条件及结果见图 4-21。

4. 长春花培养细胞中吗啉生物碱的分离^[17] 使用 Water μ Bondapak C18 (十八烷基硅烷) 反相色谱柱，按 Perkin-Elmer 3B 编序，溶剂系统分配如下：

	平衡	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
A 乙腈	35	40	55	85	90	90
B. 10mM 磷酸缓冲液(pH7.5)	75	55	45	15	10	10
时间(分)	0	10	10	25	5	5
曲线		2	1	4	1	1

色谱结果如图 4-22。

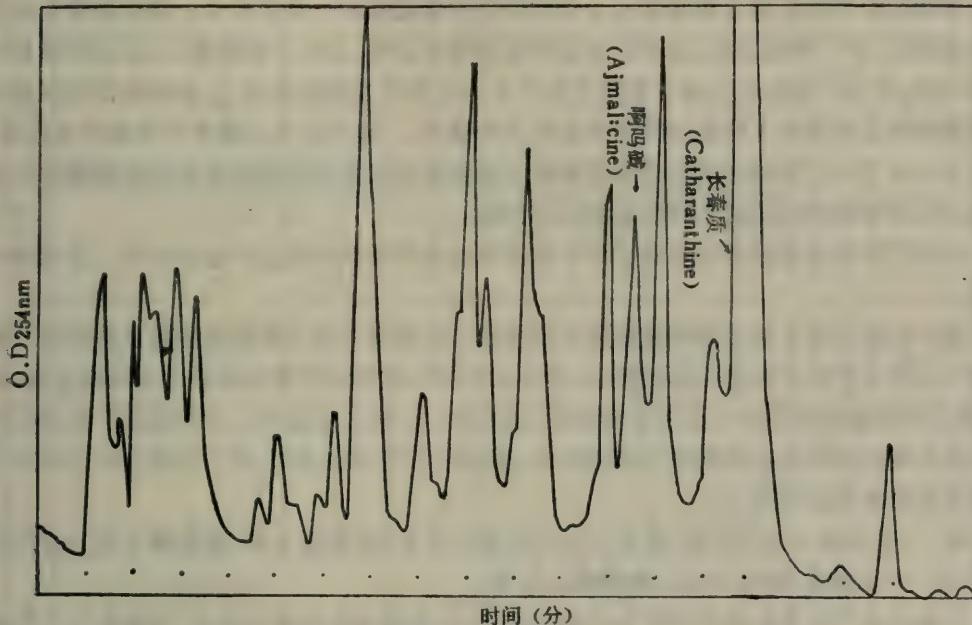


图 4-22 长春花培养细胞中吲哚生物碱的分离

样品：粗生物碱 色谱柱： μ Bondapak C18 十八烷基硅烷柱 洗脱液：乙腈/10mM 磷酸缓冲液 (pH7.5) 梯度洗脱 流速：1 毫升/分 检测器：紫外，254nm

参 考 文 献

- [1] 姚广元, 古德珍: 中草药, 第五期, 41页(1982)
- [2] Morris, C. J. O. R and Morris, P., Separation Methods in Biochemistry (1976)
- [3] Mikes, O., Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods (1979)
- [4] Scott, R. P. W., *J. Chromatogr.*, **18**, 297 (1980).
- [5] Brockmann, H. and Schodder, H., *Chem. Ber.*, **74**, 73 (1941)
- [6] Chi Hong Chu and Pietrzyk, D. J., *Anal. Chem.*, **46**, 330 (1970)
- [7] Repaske, R., in "Methods in Enzymology" Vol 22, p. 325 (1971)
- [8] Reicherberg, D. J., *Am. Chem Soc.*, **75**, 589 (1953)
- [9] Royd, C. E., Adamson, A. W. and Myers, L. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2836 (1947)
- [10] Moore, S. and Stein, W. H., *J. Biol. Chem.*, **192**, 663 (1951)
- [11] Moore, S., Spackman, D. H. and Stein, W. H., *Analyt. Chem.*, **30**, 1190 (1958)
- [12] Khym, J. X. and Zill, L. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2090 (1952)
- [13] 中国科学院微生物研究所编: 核苷酸类物质的生产和应用。科学出版社 (1971)
- [14] Tenanee G. Cooper, The Tools of Biochemistry (1977)
- [15] L. R. 斯奈德, J. J. 柯克兰著, 杨明彪, 翟纯译: 现代液相色谱法导论, 化学工业部出版社(1980)
- [16] Rabel, F. M. et al. *J. Chromatogr.*, **126**, 731(1976)
- [17] 苏拔贤、胡昌序、李兆良: 未发表的工作。

第五章 生物大分子的色谱分离法

程 明 哲

生物大分子的色谱分离法是六十年代以后发展起来的一类新技术。包括多糖基离子交换色谱法、分子筛色谱法、亲和色谱法和色谱聚焦法等。这类方法的建立，其原理虽然不完全相同，如分子筛色谱分离主要建立在分子大小形状差别的基础上，亲和色谱则根据分子生物功能团对载体上的配基的特殊亲和力而建立。但在总体上都属于色谱分离范畴，即生物大分子与其他组份的分离主要依赖于溶质彼此间理化性质的差别在固相载体和流动相之间分布和流动速度不同而达到分离目的。

生物大分子色谱分离与生物小分子色谱分离在固相载体性质和色谱条件上要求稍有不同。

第一生物大分子要求固相载体具有亲水性，并具有一定三维空间结构及疏散度。使生物大分子易于接近和出入固相部分，通过表面吸附或筛眼作用达到分子之间的分离，此外，要求固相载体对生物大分子生理活性有稳定作用，按上述要求，各种来源于生物材料的凝胶及其衍生物是比较理想的固相载体，凝胶的使用，是生物大分子色谱分离近年来得以迅速发展最主要原因之一。

第二，与生物小分子比较，生物大分子色谱分离条件（包括上柱、洗脱等工序），要求比较温和。一切强酸、强碱、高压、高温都不适用。

生物大分子色谱分离在近代生化制备技术中，在细分阶段使用较多，效果也远比其他方法好。因每一种色谱原理和方法所涉及的知识面都很广，在本丛书其他分册中已另有详细介绍，这里为了对生化制备技术有一系统认识，只结合制备有关方面作一简要补充介绍。

第一节 多糖基离子交换剂色谱法

这类交换剂中应用最广泛的有离子交换纤维素和离子交换交联葡聚糖两类，另外，还有离子交换琼脂糖，但应用不广。其中离子交换剂特别适用于生物大分子活性物质（如蛋白质、核酸及其衍生物）的分离。因为这类交换剂的多糖骨架来源于生物材料，具亲水性、对生物活性物质是一个十分温和的环境。它们的色谱原理与离子交换树脂基本相同^[1,2,3]。

一、多糖基离子交换剂的分类

（一）离子交换纤维素

离子交换纤维素是开放性的长链骨架，大分子物质也能自由地进入和迅速地扩散，它也有较大的表面，故对生物大分子的吸附容量比离子交换树脂大得多。另外，由于离子交换纤维素上所含的离子交换基团较少，排列疏散，所以对大分子的吸附也不太牢固，用较

表 5-1 离子交换纤维素

类 型	离子交换剂名称	活性基结构	简 写	交換当量 meq/g	pK'*	特 点	
						阳 离 子 交 换 纤 维 素	阴 离 子 交 换 纤 维 素
强 酸型	甲基磺酸纤维素	$\text{O}=\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{O}^-$	SM				
	乙基磺酸纤维素	$\text{O}=\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}^-$	SE	0.2-0.3	2.2		用于极低 pH
	磷酸纤维素	$\text{O}=\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-\text{O}^-$	P	0.7-7.4	pK ₁ 1-2 pK ₂ 6.0-6.2		用于低 pH
	羧甲基纤维素	$\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{O}^-$	CM	0.5-1.0	3.6		适用于中性和碱性蛋白质分离; 在 pH>4 应用
中 强 酸型	二乙基氨基乙基纤维素	$\text{C}_2\text{H}_5-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{O}^-$	DEAE	0.1-1.1	9.1-9.2		在 pH<8.6 应用, 适用于中性和酸性蛋白质的分离
	三乙基氨基乙基纤维素	$\text{C}_2\text{H}_5-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3-\text{CH}_2-\text{O}^-$	TEAE	0.5-1.0	10		
	酰乙基纤维素	$\text{C}_2\text{H}_5-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}^-$	GE	0.2-0.5	>12		在极高 pH 仍可使用
	氨基乙基纤维素 ECTEOLA-纤维素 苄基化的 DEAE 纤维素 苄基化壳酰胺 DEAE 纤维素 聚乙亚胺吸附的纤维素	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_2$ $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5\text{NH})_2$ $-(\text{C}_2\text{H}_5\text{NH})_6-\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_2$	AE ECTEOLA DBD BND PEI	0.3-1.0 0.1-0.5 0.8 0.8 0.1-0.3	8.5-9.0 7.4-7.6 — — 9.5		适用于分离核苷、核酸和病毒, 适用于分离核酸, 适用于分离核酸 适用于分离核苷酸
弱 酸型	对氨基苄基纤维素	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$	PAB	0.2-0.5			

* pK 为在 0.5 N NaCl 中的表观解离常数负对数

温和的条件就能将其洗脱下来,再加上纤维素的亲水性质,这就使生物大分子在吸附和洗脱过程中不致因变性而失活。

根据它们联结在纤维骨架上的交换基团,可分阳离子交换纤维素和阴离子交换纤维素两类。阳离子交换纤维素又可分为强酸型、中强酸型、弱酸型三种;阴离子交换纤维素也可分为强碱型、中强碱型、弱碱型三种,常用的离子交换纤维素及其特性如表 5-1 所示。

根据离子交换纤维素存在的物理状态,又可分为纤维型和微粒型两类。微粒型纤维素颗粒细,溶涨性小,能装成紧密而分离效率高的吸附柱,适用于分析,而纤维较长的纤维型纤维素适用于制备。

(二) 离子交换交联葡聚糖

离子交换交联葡聚糖是将离子交换基团连结于交联葡聚糖上制成各种交换剂,由于交联葡聚糖具有三度空间网状结构,因此,离子交换交联葡聚糖既有离子交换作用,又有分子筛作用。

表 5-2 常用的离子交换葡聚糖和琼脂糖 (meq/g)

商品名	化学名	类型	活性基结构	反离子	对小离子 吸附容量 (meq/g)	对血红 蛋白吸 附容量 g/g	稳定 pH
CM-Sephadex G-25	羧甲基	弱酸阳离子	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Na^+	4.5 ± 0.5	0.4	6-10
CM-Sephadex G-50	羧甲基	弱酸阳离子	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Na^+		9	
DEAE-Sephadex A25	二乙基氨基乙基	中强碱阴离子	$-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Cl^-	3.5 ± 0.5	0.5	9-2
DEAE-Sephadex A50	二乙基氨基乙基	中强碱阴离子	$-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Cl^-		5	
QAE-Sephadex A25	季胺乙基	强碱阴离子	$-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+-\text{(C}_2\text{H}_5)_2$ $\quad $ $\quad \text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Cl^-	3.0 ± 0.4	0.3	10-2
QAE-Sephadex A50	季胺乙基	强碱阴离子	$-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+-\text{(C}_2\text{H}_5)_2$ $\quad $ $\quad \text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Cl^-		6	
SE-Sephadex C25	磺乙基	强酸阳离子	$-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3^-$	Na^+	2.3 ± 0.3	0.2	2-10
SE-Sephadex C50	磺乙基	强酸阳离子	$-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3^-$	Na^+		3	
SP-Sephadex C25	磺丙基	强酸阳离子	$-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^-$	Na^+	2.3 ± 0.3	0.2	10-2
SP-Sephadex C50	磺丙基	强酸阳离子	$-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^-$	Na^+		7	
CM-Sepharose CL-6B	羧甲基	弱酸阳离子	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Na^+	13 ± 2	10.0	3-10
DEAE-Sepharose CL-6B	二乙基氨基乙基	中强碱阴离子	$-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Cl^-	12 ± 2	10.0	3-10

离子交换交联葡聚糖有很高电荷密度,故比离子交换纤维素有更大的总交换量,但当洗脱介质的 pH 或离子强度变化时,会引起凝胶体积的很大的变化,由此而影响流速,这是它的一个缺点。

常用的离子交换交联葡聚糖及其某些特性见表 5-2。

二、实验操作技术

(一) 多糖基离子交换剂的选择^[4,5]

与离子交换树脂的选择相似,一般情况下,带正电的物质用阳离子交换剂;带负电物质用阴离子交换剂。物质的带电性质用电泳法确定。对于已知等电点的两性物质,可

根据其等电点及介质的 pH 确定其带电状态，同时考虑该物质的稳定性和溶解度，选择合适的 pH 范围。

实验室中最常用的为 DEAE-纤维素，CM-纤维素或 DEAE-Sephadex, CM-Sephadex。如需在低 pH 下操作时，可用 P-纤维素，SE-纤维素或 SE-Sephadex，而需在 pH 10 以上操作的可用 GE-纤维素。对于大分子两性物质(如蛋白质)，其选择情况见图 5-1。

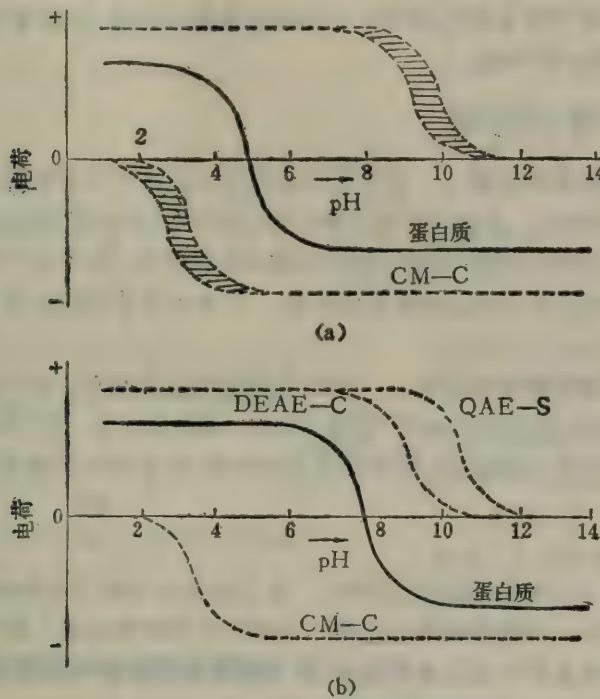


图 5-1 蛋白质色谱的离子交换剂的选择

(a) 酸性蛋白，(b) 碱性蛋白

图 5-1 (a) 表示酸性蛋白(等电点约为 5)的解离曲线和 DEAE-纤维素及 CM-纤维素的解离曲线。蛋白质作为一个阴离子在 DEAE-纤维素柱色谱可在 pH 5.5—9.0 范围内进行，在这个 pH 范围内，蛋白质和交换剂都是解离的，带相反的电荷。在 CM-纤维素上色谱则严格限于较窄的 pH 范围内 (pH 3.5—4.5) 进行。

图 5-1 (b) 表示碱性蛋白质 ($pI = 8$) 和羧甲基纤维素，DEAE-纤维素及强碱阳离子交换剂 QAE-Sephadex 的解离曲线。蛋白质作为一个阳离子在羧甲基纤维素上色谱可在 pH 3.5—7.5 之间进行，如作为阴离子在 DEAE-纤维素上色谱则仅限于 pH 8.5—9.5 的范围内进行，用 QAE-Sephadex 则在 pH 8.5—11.0 之间进行。

(二) 缓冲液的选择

对缓冲液 pH 的选择，决定于被分离物质的等电点、稳定性和溶解度。也就是说，要选择这样的缓冲液条件，保证被分离的组份有足够的溶解度，并且不会变性失活。选择 pH 时，也要考虑离子交换剂的 pK 值，用阴离子交换剂时，pH 要小于 pK ，用阳离子交换剂时 pH 要大于 pK 。

起始缓冲液的浓度要尽可能的低些(如 0.001—0.01 M)，使色谱柱上能吸附更多的被

分离物质。为了获得足够的缓冲容量，选用的缓冲液离子，其 pK 值要尽量接近起始缓冲液的 pH 值（最好在 0.5 个 pH 单位之内）。

在进行梯度洗脱时，多采用离子浓度梯度，尽可能不用 pH 梯度，因为 pH 过高或过低可能引起一些蛋白质的变性失活，而且 pH 偏离 pK 值过远，会降低溶液的缓冲能力，而提高离子浓度不仅增加洗脱能力，还可增加溶液的缓冲能力。

为了在不提高缓冲离子的浓度情况下增加洗脱能力，常在缓冲液中加入适当的 NaCl 、 KCl 、 LiCl 等非缓冲盐。

（三）多糖基离子交换剂的处理：

1. 离子交换纤维素的处理 将离子交换纤维素悬浮于大体积的水中让其自然沉降，用倾倒法除去细颗粒。然后采用碱—酸—碱的顺序反复洗涤，除去杂质及活化交换基团。即先用 0.5 N NaOH 浸泡 1 小时，然后蒸馏水洗至中性，再用 0.5 N HCl 浸泡，水洗至中性，用 0.5 N NaOH 洗，最后充分用水漂洗。再把其调节到起始缓冲液的 pH 即可使用。

2. 离子交换交联葡聚糖的处理 将离子交换交联葡聚糖在水中使凝胶充分溶涨，然后浮洗除去细颗粒，用 0.5 N NaOH 浸泡 1 小时，水洗至中性，用 0.1—0.5 N HCl 浸泡，水洗至中性，再以 0.5 N NaOH 洗，最后用水充分漂洗，除去空气后备用。

（四）装柱

装柱方法有重力沉降法和加压法两种。重力沉降法与离子交换树脂的装柱法相似（见第四章）。加压法：在色谱柱顶上连接一个耐压的厚壁梨型瓶，其中贮放离子交换剂的悬浮溶液。梨型瓶直接与加压装置连接（氮气钢瓶或压缩空气钢瓶），将柱按十等分划线，开始加 0.3 个大气压，沉积床每升高一个刻度，增加 0.07 个大气压，最后达到一个大气压立刻减压。装柱时要不时振荡梨型瓶使悬浮液均匀，另外，用提高贮液器高度的办法进行加压，也能得到好的效果。

（五）加样

加样量的多少和体积主要取决于待分离组份的浓度及其对交换剂的亲和力。也要考虑实验的目的要求，假如待分离组份含量很低，被吸附又很牢固，则加样的量和体积可以相当高。如果要求高分辨率时，加样量不得使紧密吸附的区带超过床体积的 10%。

样品上柱前要以起始缓冲液充分平衡，常用的方法为：（1）样品在 4°C 下对 20 倍体积的起始缓冲液透析。（2）凝胶过滤法：用 Sephadex G-25 或 G-50 装柱，先用起始缓冲液平衡，然后加样，再用起始缓冲液洗脱。蛋白质在一个外水体积 (V_0) 流出。

加样方法与一般柱色谱法相似。

（六）洗脱

加样后，用足够量的起始缓冲液洗柱，除去未吸附的物质，再进行洗脱。

洗脱的办法可采用（1）改变缓冲液的 pH，使大分子的电荷减少，从吸附状态变为解吸。（2）增加缓冲液的离子强度，使离子的竞争力加大，将大分子从交换剂上置换下来。

通常使用的洗脱方式为分段洗脱或梯度洗脱。

三、应用实例

(一) DEAE-纤维素柱色谱分离人血清蛋白(图 5-2)

DEAE-纤维素用 Tris-磷酸缓冲液 (0.005 M , pH 8.6) 平衡, 以 0.5 M Tris-磷酸缓冲液洗脱。从图中看出, IgG 型的免疫球蛋白最先出现(即组份 1—6), 峰 8 是铁传递蛋白, 在组份 10 和 11 中发现脂蛋白, 接着是结合球蛋白和血红蛋白(光吸收在 405 nm), 11—14 的大峰主要为血清白蛋白, 从 15 起是一个复合物, 包括 α 和 β 球蛋白, 16 和 17 发现 IgM 巨球蛋白; 组份 20 为含铜的血浆铜蓝蛋白。凝血酶和 α -酸性糖蛋白也存在色谱区内。随后又发现一些其他蛋白质存在, 如类风湿因子和维生素 B_{12} 结合蛋白。

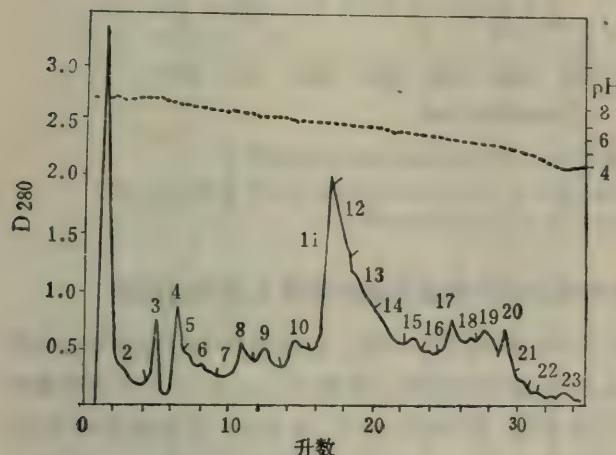


图 5-2 在 DEAE-纤维素上人血清蛋白的色谱图^[6]

结合蛋白。

(二) 在羧甲基纤维素柱色谱分离卵清蛋白

约 2 克混合的卵清蛋白, 色谱柱 14×2 厘米, 用醋酸铵- Na_2CO_3 缓冲液, pH 4.4—1.0 分步洗脱, 一个典型的洗出液曲线如图 5-3。

图峰 A 包括卵粘蛋白和黄素蛋白, 峰 C、D 和 E 各为卵清蛋白 A_1 、 A_2 和 A_3 , 峰 G 和 H 含伴清蛋白, 而峰 L 和 N 各为抗生素蛋白和溶菌酶。其中卵清蛋白还可在 pH 3.7 下重复色谱与黄素蛋白分离。

(三) 大肠杆菌的 30S 核蛋白体亚单位的蛋白色谱分级分离

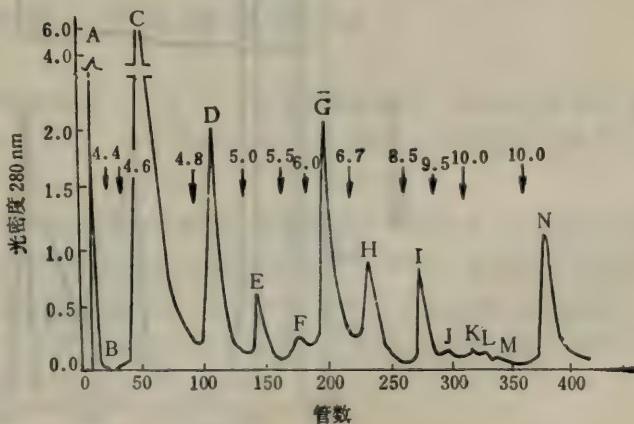


图 5-3 在 CM-纤维素上卵白蛋白的分级分离^[7]

以磷酸纤维素(交换量 0.9 — 1.1 毫克当量/克)为固定相, 0 — 0.6 M NaCl (在 6M 尿素 -0.05 M NaH_2PO_4 — 0.012 M 甲胺, pH 6.5, 每升含 $50\text{ }\mu\text{l}$ 2-巯基乙醇) 的线性梯度溶液洗脱, 一个典型的洗脱曲线如图 5-4。

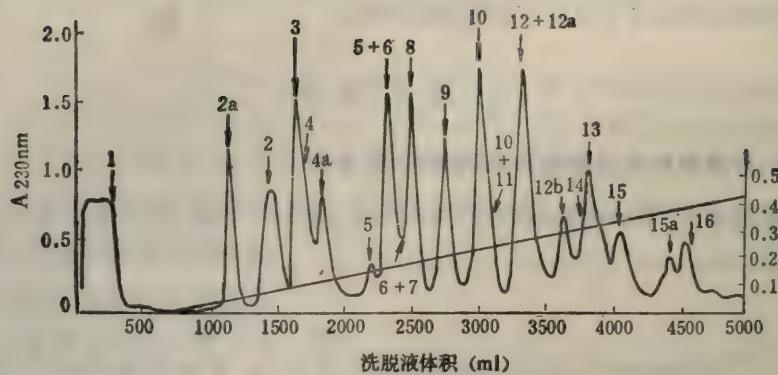


图 5-4 在磷酸纤维素上 30 S 核蛋白体亚单位蛋白的色谱图^[18]
有二十多个峰, 其中 10—11 相当于单一成份, 在大峰中的混合物可在 pH5.5 的同样体系中
(或 Sephadex G-100) 重复色谱分离

(四) ECTHAM-纤维素柱色谱分离哺乳动物肝抽提液的线粒体上清液的组份

用 0.005 M Tris-HCl, pH 7.5 (含 0.005 M $MgCl_2$) 平衡, 在抽提液中大部分可溶性蛋白和糖原无阻留地通过色谱柱。加进 0.9% 的非离子型去垢剂 (Triton X-100) 以除去微粒体脂蛋白。核蛋白体用 0—2 M NaCl (或 KCl) 和 0.005—0.02 M $MgCl_2$ 的梯度溶液洗脱, 结果如图 5-5。峰 I 包括可溶性蛋白, 峰 II 为 Triton X-100 洗脱物, 而双峰包括核糖体, 第一组分为 RNP I, 在 0.04 M NaCl 洗脱, 主要含 83 S 核蛋白粒, 而第 II 组分 RNP II 在 0.14 M NaCl 洗脱, 主要含 77S 核蛋白。

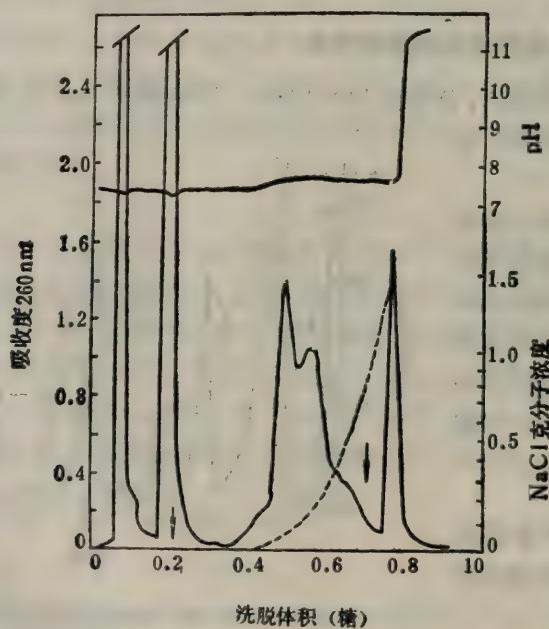


图 5-5 在 ECTHAM-纤维素色谱柱上分离核糖体^[19]

RNP I 和 RNP II 在核酸含量上也有差别, RNP I 在重复色谱时不可逆地转为 RNP II。

(五) CM-Sephadex G 25 柱色谱分离眼镜王蛇蛇毒组份

分离条件如下：CM-Sephadex G 25 用 0.05 M 醋酸钠缓冲液 (pH 5.8) 浸泡上柱并平衡。柱 2.5×60 厘米。广西产眼镜王蛇蛇毒 1 克溶于 9 毫升上述缓冲液中上柱。洗脱分三步：(1) 用平衡缓冲液洗脱；(2) 0—0.43 M NaCl 梯度洗脱；(3) 0.43—0.64 M NaCl 梯度洗脱。每管 6 毫升，每小时 24 毫升，得 17 个蛋白质峰如图 5-6。

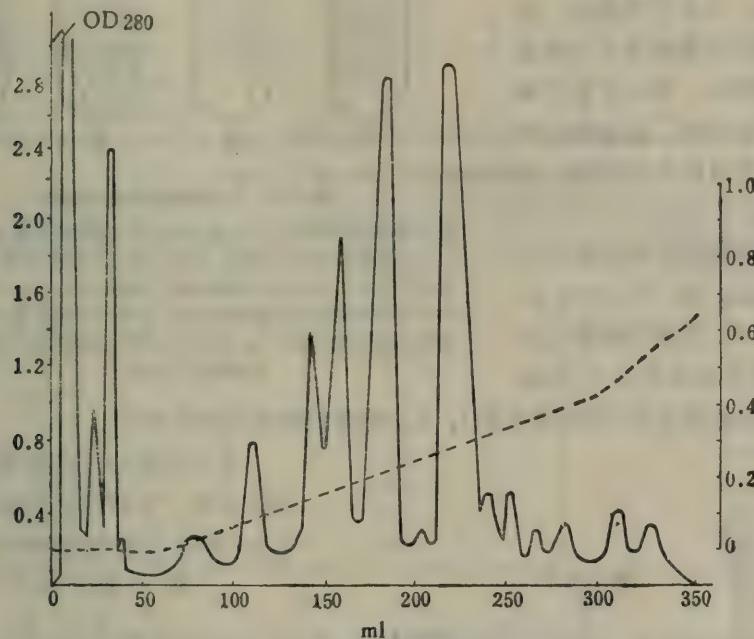


图 5-6 眼镜王蛇蛇毒柱色谱图谱^[10]

第二节 分子筛色谱

分子筛色谱又称凝胶色谱或凝胶过滤，它是六十年代发展起来的一种快速简便的生物化学分离分析方法，目前已在生物化学、分子生物学、生物工程学以及医药学等有关领域中得到广泛的应用。^[11-14]

分子筛色谱是指混合物随流动相经固定相(凝胶)的色谱柱时，混合物中各组份按其分子大小不同而被分离的技术。固定相(凝胶)是一种不带电荷的具有三维空间的多孔网状结构的物质，凝胶的每个颗粒的细微结构就如一个筛子，小的分子可以进入凝胶网孔，而大的分子则排阻于凝胶颗粒之外，因而具分子筛的性质。又因整个色谱过程一般不变换洗脱液，好像过滤一样，故也称凝胶过滤。

一、分子筛色谱的基本原理

当含有大小分子的混合物样品加入到色谱柱中，这些物质随洗脱液的流动而移动。大小分子(指分子量)流速不同，分子量大的物质(阻滞作用小)沿凝胶粒子间的孔隙随洗

脱液移动，流程短，移动速度快，先洗出色谱柱；而分子量小的物质（阻滞作用大）可通过凝胶网孔进入粒子内部，然后再扩散出来，故流程长，移动速度慢，最后流出色谱柱（见图 5-7）。也就是说，分子筛色谱的基本原理是按溶质分子量的大小，分别先后流出色谱柱，大分子先流出，小分子后流出。当两种以上不同分子量的分子均能进入凝胶粒子内部时，则由于它们被排阻和扩散程度不同，在色谱柱内所经过的时间和路程长短不同，从而也得到分离。

分子筛色谱柱的总床体积(V_t)可分为三个组分，即： $V_t = V_o + V_i + V_m$ 。式中， V_o 为凝胶颗粒之间液体的体积(即外水体积)， V_i 为凝胶颗粒内所含的液体体积(即内水体积)， V_m 为凝胶颗粒本身的体积。

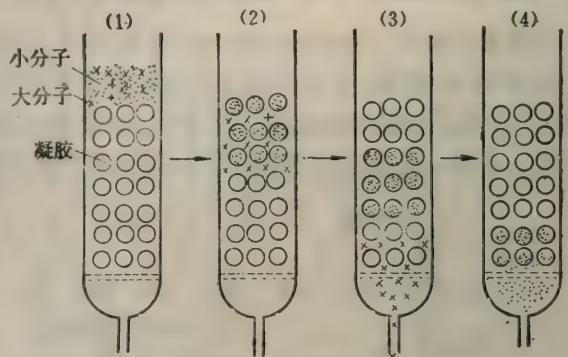


图 5-7 分子筛色谱分离示意图

(1) 样品(其中含有大、小不同的分子)溶液加在色谱柱顶端；
(2) 样品溶液流经色谱柱，小分子通过扩散作用进入凝胶颗粒的微孔中，而大分子则被排阻于颗粒之外。大、小分子因向下移动的速度发生差异而将大、小分子分离开来；(3) 向色谱柱顶加入洗脱液，大、小分子分开的距离增大；(4) 大分子已经流出色谱柱

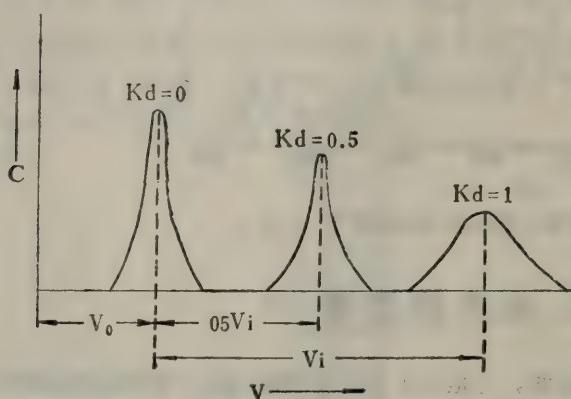


图 5-8 分子筛色谱的区带轮廓图

质分子(小分子)完全向凝胶颗粒内扩散，在洗脱过程中将最后流出柱外，通常 $0 < K_d < 1$ ，意味着溶质分子以某种程度向凝胶颗粒内扩散， K_d 愈大，进入凝胶颗粒内的程度愈大，在中间情况下，例如 $K_d = 0.5$ 时，其洗脱体积 $V_e = V_o + 0.5V_i$ (见图 5-8)。

因此 $V_o < V_e \leq (V_o + V_i)$ ，相应为 $0 < K_d \leq 1$ 。实际上， K_d 很难达到大于 0.8—0.9。

上式中总床体积 V_t ，可由圆柱形色谱柱的体积计算 ($V = \frac{1}{4} \pi D^2 h$)，而外水体积 (V_o) 的测定，可采用一个分子量远超过凝胶排阻极限的有色大分子的溶液通过色谱床，其洗脱体积就等于 V_o 。最常用的参照物为蓝葡萄糖 2000。 V_i 的测定则可选用一个自由扩散的小分子(如中性盐类)通过色谱床，此时， $K_d = 1$ ，则 $V_i = V_e - V_o$ 。表 5-3, 5-4 列举了某些凝胶的性质。

分配系数 (K_d) 是分子筛色谱的一个特征常数，即溶质在流动相和固定相之间分配的

每个溶质分子在流动相和固定相之间有一个特定的分配系数(称 K_d)。所以，它的洗脱体积 (V_e) 为：

$$V_e = V_o + K_d V_i$$

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

当 $K_d = 0$ 时， $V_e = V_o$ ，即溶质分子(高分子)完全不能进入凝胶颗粒内，完全被排阻于凝胶颗粒微孔之外而最先洗脱下来，当 $K_d = 1$ 时，即 $V_e = V_o + V_i$ ，说明这种溶

表 5-3 Sephadex 分子筛物质的性质

型号 G-X	得水值 (克/克干胶)	床体积 V _t (毫升/克干胶)	外水体积 V _o (毫升/克干胶)	内水体积 V _i (毫升/克干胶)	湿密度 (克/毫升)
G-10	1.0±0.1	2	0.8	1.0	1.24
G-15	1.5±0.2	3	1.1	1.5	1.19
G-25	2.5±0.2	5	2.0	2.5	1.13
G-50	5.0±0.3	10	4	5	1.07
G-75	7.5±0.5	13	5	7	1.05
G-100	10.0±1.0	17	6	10	1.04
G-150	15.0±1.5	24	8	15	1.03
G-200	20.0±2.0	30	9	20	1.02

表 5-4 Bio-Gel 分子筛色谱物质的性质

型号 P-X	得水值 (克/克)	床体积 V _t (毫升/克)
P-2	1.5	3.8
P-4	2.4	5.8
P-6	3.7	8.8
P-10	4.5	12.4
P-30	5.7	14.8
P-60	7.2	19.0
P-100	7.5	19.0
P-150	9.2	24.0
P-200	14.7	34.0
P-300	18.0	40.0

比例。

由于式中 V_i 不易正确测定, 而 V_m 所造成的偏差又不大, 故若把整个凝胶都作为固定相, 则分配系数以 K_{av} 表示(文献中 K_d 及 K_{av} 均有使用)。

$$K_{av} = \frac{V_c - V_o}{V_t - V_o} \text{ 或 } K_{av} = \frac{K_d V_i}{V_t - V_o}$$

二、常用凝胶的结构和性质

(一) 交联葡聚糖凝胶

1959 年 Porath 和 Flodin 首先合成了交联葡聚糖凝胶^[11], 因其具有良好的化学稳定性等优点, 目前在分子筛色谱中已成为最常用的凝胶, 商品名为 Sephadex。

交联葡聚糖的基本骨架是葡聚糖 (dextran), 它是一种以右旋葡萄糖为残基的多糖, 分子间主要是 α -1,6 糖苷键(约占 95%), 分枝为 1,3 糖苷键(约占 5%), 以 3-氯-1,2-环氧丙烷 ($Cl-CH_2-CH(O)-CH_2$) 为交联剂, 将链状结构连接成为三维空间的网状结构的高



分子化合物, 其网孔大小可通过调节交联剂和葡聚糖的配比及反应条件来控制, 交联度越大, 网孔结构越紧密; 交联度越小, 网孔结构越疏松。交联葡聚糖的结构如下页。

表 5-5 列出 8 种 Sephadex 对蛋白质和多糖的平均分级范围。从表中可看出它们对这两类不同化合物的分级范围各不相同, 这意味着这两类化合物在溶液中有不同的物理

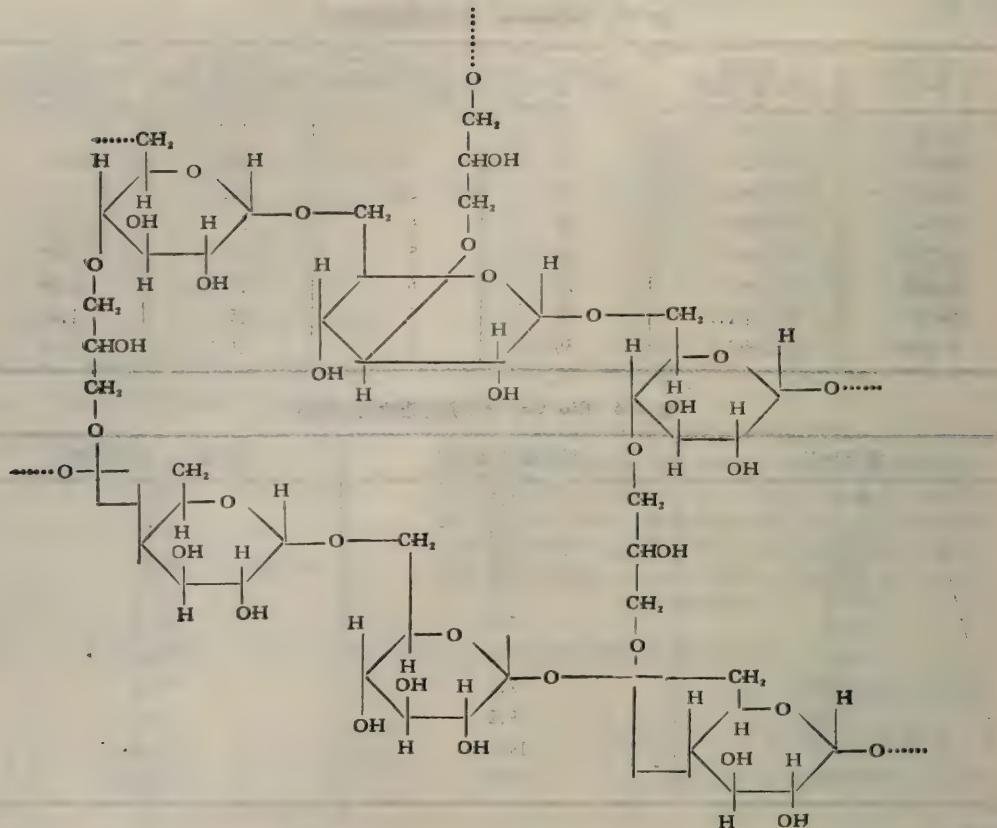


图 5-9 交联葡聚糖的化学结构

结构。蛋白质为紧密的椭圆形的结构,而多糖主要是无规则线团的链状结构,其旋转半径可能比相同分子量的蛋白质分子大。同样的情况也出现在核酸中,因为核酸在溶液中有一种类棒状结构,它们的聚集状态受洗脱液的组成,特别是某些离子(如 Mg^{++})的浓度影响很大。

表 5-5 Sephadex 的分级范围

型 号	能分级的分子量	
	球状蛋白质	葡 聚 糖
G-10	<700	<700
G-15	<1500	<1500
G-25	1000—5000	100—5000
G-50	1500—30,000	500—10,000
G-75	3000—70,000	1000—50,000
G-100	4000—150,000	1000—100,000
G-150	5000—400,000	1000—150,000
G-200	5000—800,000	1000—200,000

葡聚糖凝胶是一种化学性质比较稳定的物质,不溶于水、弱酸、碱和盐溶液,也不溶于

一般有机溶剂中。但在强酸中，凝胶的糖苷键易水解，一般在 0.02 N HCl 低温下能保持半年，在碱性环境下却十分稳定，如 Sephadex G-25 在 0.25 N NaOH 中，60℃ 经两个月仍不改变其色谱性质，故常用 0.5 N NaOH（含 0.5 N NaCl⁻）来除去残留在凝胶上的变性蛋白质及其他杂质。此外，Sephadex 结构上的羟基在过强的碱性下对氧敏感，易氧化成酸。凝胶对热稳定，湿态凝胶在 110℃ 高压灭菌 40 分钟，性质不变，干态凝胶可耐受 120℃ 左右。

由于 Sephadex 中含有许多亲水性羟基，故干胶有很强的吸水性，吸水性主要取决于网孔大小，不同型号的 Sephadex 用 G 表示，在 G 后面的阿拉伯数字为凝胶得水值再乘以 10，G 值愈大，则得水值愈大。

表 5-6 列举某些常用物质的葡聚糖凝胶分子筛色谱的 K_d 值：

表 5-6 某些常用物质的 Sephadex 分子筛色谱的 K_d 值

化 合 物	K _d 值				
	G-25	G-50	G-75	G-100	G-200
纤维蛋白原	0	0	0	0	0
r-球蛋白 (19S)	0	0	0	0	0
r-球蛋白 (7S)	0	0	0	0	0.2
铁传递蛋白	0	0	0	0.1	0.3
血清清蛋白	0	0	0	0.2	0.4
血红蛋白	0	0	0.1	0.3	0.5
藻红蛋白	0	0	0	0	0
藻青蛋白	0	0	0	0	0.2
卵清蛋白	0	0	0	0.2	—
胰蛋白酶	0	0	0.3	0.5	0.7
糜蛋白酶	0	0	0.3	0.5	0.7
胃蛋白酶	0	0	0.3	—	—
细胞色素 c	0	0	0.4	0.7	—
溶菌酶	0	0	—	0.7	—
核糖核酸酶	0	0	0.4	—	—
甘氨酸	0.9	—	0.1	—	—
苯丙氨酸	1.2	1.0	—	—	—
酪氨酸	1.4	1.1	—	—	—
色氨酸	2.2	1.6	1.2	—	—
KCl	1.0	1.0	—	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.9	—	—	—	—

（二）聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺凝胶也是一种人工合成凝胶，其商品名为生物凝胶-P (Bio-Gel-P)，和交联葡聚糖一样，为颗粒状干粉，在溶剂中能自动吸水溶涨成凝胶。其组成单位是丙烯酰胺 ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CONH}_2$)，(称为单体) 和交联剂(甲叉双丙烯酰胺，简称 Bis) 通过自由基引发聚合反应形成聚丙烯酰胺，经干燥粉碎加压成形处理即成为生物凝胶，只要控制单体用量和交联剂的比例就能得到不同型号的凝胶。

表 5-7 不同单体含量 (T) 和交联度 (C) 的聚丙烯酰胺凝胶上蛋白质的分配系数*(K_{vT})¹¹

蛋白质	分子量 $\times 10^3$	stokes 半径 (nm)	(二)						5						7						9					
			T=7	9	11	13	15	7	9	11	5	7	9	11	5	7	9	11	5	7	9	11	5	7	9	
乳清蛋白	12.4	2.01	0.67	0.59	0.44	0.38	0.31	0.45	0.38	0.28	0.57	0.40	0.31	0.28	0.53	0.44	0.32	0.25	0.62	0.47	0.36	0.28				
大豆蛋白酶抑制剂	21.5	2.26	0.65	0.53	0.37	0.31	0.25	0.42	0.35	0.24	0.46	0.37	0.26	0.20	—	0.41	0.27	0.20	0.62	0.43	0.31	0.25				
碳酸酐酶(人红血球)	31.0	2.35	0.59	0.48	0.31	0.235	0.17	0.36	0.24	0.17	0.47	0.30	0.20	0.13	—	0.32	0.21	0.15	0.53	0.38	0.25	0.19				
卵清蛋白	45.0	2.80	0.49	0.38	0.21	0.13	0.08	0.27	0.14	0.10	0.35	0.18	0.12	0.07	0.34	0.20	0.11	0.07	0.41	0.25	0.17	0.11				
血红蛋白(人)	64.5	3.08	0.45	0.31	0.15	0.08	0.05	0.19	0.10	0.07	0.31	0.14	0.09	0.05	—	0.18	0.10	0.05	0.39	0.23	0.14	0.09				
牛血清蛋白(单体)	70.0	3.65	0.36	0.21	0.07	0.04	0.01	0.11	0.07	0.02	0.27	0.08	0.04	0.02	0.28	0.12	0.04	0.03	0.29	0.18	0.09	0.05				
血浆铜蓝蛋白(人)	151.0	4.73	0.22	0.10	0.02	—	—	0.04	0.01	—	0.15	0.02	0.01	—	—	0.03	—	—	0.06	0.02	—	—				

* 分配系数测定在 Tris-HCl 缓冲液 pH 8.76, 离子强度 0.05 中。

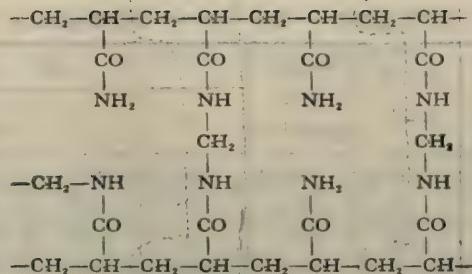


图 5-10 聚丙烯酰胺凝胶的结构

在聚丙烯酰胺凝胶的合成过程中,单体和交联剂的配比可以任意改变。Hjerten^[12]最早提出的表示记号方法已普遍采用,以(T)代表 100 毫升凝胶溶液中含有的单体和交联剂总克数,称为凝胶浓度,而其中交联剂占单体加交联剂总量的百分比称交联度,以(C)表示。如 8×25 的凝胶的制备是每 100 毫升溶液中含 6 克丙烯酰胺和 2 克 Bis.。应用于分子筛色谱中的单体浓度(T)在 5—25 之间,T 在 5 之下的凝胶太软易碎裂,T 在 25 以上的凝胶使小分子蛋白质也几乎不能穿透。实际上应用 C 值为 1—25% 之间。

聚丙烯酰胺凝胶的稳定性不如交联葡聚糖凝胶,在酸性条件下酰胺键易水解为羧基,使凝胶带有一定的离子交换基团,一般应在 pH 2—11 之间。

表 5-7 提供了一些典型的蛋白质(分子量 12,000—160,000)在聚丙烯酰胺凝胶色谱上的 K_{av} 值。

表 5-8 列举了各种型号 Bio-Gel P 的分级范围。

表 5-8 Bio-Gel P 的分级范围(球形分子)

型 号	分级范围(分子量)
Bio-Gel P-2	170—2600
Bio-Gel P-4	600—3500
Bio-Gel P-6	1000—5000
Bio-Gel P-10	2500—40,000
Bio-Gel P-30	3000—50,000
Bio-Gel P-60	5000—65,000
Bio-Gel P-100	5000—100,000
Bio-Gel P-150	5000—200,000
Bio-Gel P-200	40,000—250,000
Bio-Gel P-300	50,000—600,000

(三) 琼脂糖凝胶

琼脂是一种天然存在的多糖混合物,它来源于几种海藻。Araki^[14]认为,琼脂主要由两部分组成,一为中性链状多糖,称琼脂糖(agarose),其结构是由 β -D-吡喃型半乳糖和 3,6-脱水-L-吡喃半乳糖相间结合的链状多糖;另一为带负电荷的琼脂糖(agaropectin),含有磺酸基和羧基,可采用氯代十六烷吡啶,聚乙烯醇等把琼脂胶沉淀而除去。

琼脂糖凝胶的商品名因生产厂家不同而异,目前有 Sepharose(瑞典); Sagavac(英国); Bio-Gel A(美国); Gelarose(丹麦); Super Ago-Gel(美国)。

表 5-9、5-10 列举了某些蛋白质在 Sagavac 和 Sepharose 凝胶上的 K_{av} 值:

表 5-9 几种蛋白质在 4—10% Sagavac 琼脂糖凝胶上的 K_{av} 值

蛋白 质	分子量 $\times 10^3$	stokes 半径 厘米 $\times 10^{-8}$	琼 脂 糖				
			10	8	6	5	4
肌红蛋白	17	20.0	0.60	0.70	—	—	0.88
过氧化物酶(辣根)	40	30.0	0.33	0.50	—	—	0.82
酵母醇脱氢酶	150	45.5	0.11	0.23	—	0.50	0.70
谷氨酸脱氢酶	258	60.0	0.02	0.08	0.02	0.37	0.58
甲状腺球蛋白	670	83.0	—	—	—	0.20	0.42
芜菁黄花叶病毒	3500	~120.0	—	—	—	0.07	0.19

表 5-10 几种蛋白质在 Sephadex G-200 Sepharose 4B 和 6B 上的 K_{av} 值

蛋白 质	分子量 $\times 10^3$	stokes 半径 厘米 $\times 10^{-8}$	Sephadex G-200		Sephadex G-200
			4B	6B	
核糖核酸酶	13.7	19.2	0.86	0.78	0.75
卵清蛋白	45	27.3	0.72	0.62	0.53
铁传递蛋白	71	36.1	0.68	0.53	0.40
葡萄糖氧化酶	186	56.1	0.60	0.42	0.27
甲状腺球蛋白	670	82.5	0.45	0.27	0.00
α -结晶蛋白	1000	—	0.38	0.22	0.00

(四) 交联葡聚糖 LH-20 (Sephadex LH-20)

交联葡聚糖 LH-20 是亲脂性 Sephadex 的衍生物，能在有机溶剂中溶涨，溶涨的性质决定于原凝胶的交联度，羟基取代的程度，溶剂的性质等。

Sephadex LH-20 是交联葡聚糖的羟基被羟丙酰基 [HO(CH₂)₂—CH₂O—] 所取代，已成为商品，可用于分离脂溶性的物质。

Sephadex LH-20 在各种有机溶剂中的性质见表 5-11。

表 5-11 交联葡聚糖 LH-20 的性质

溶 剂	得溶剂值毫升/克干胶	床体积毫升/克干胶
二甲基甲酰胺	2.2	4.0—4.5
水	2.1	4.0—4.5
甲醇	1.9	4.0—4.5
乙醇	1.8	3.5—4.5
氯仿(用 1% 乙醇稳定)	1.8	3.5—4.5
氯仿	1.6	3.0—3.5
正丁醇	1.6	3.0—3.5
二氯杂环己烷	1.4	3.0—3.5
四氢呋喃	1.4	3.0—3.5
丙酮	0.8	
乙酸乙酯	0.4	
甲苯	0.2	

三、分子筛色谱的实验技术

(一) 凝胶的选择及处理

交联葡聚糖、琼脂糖和交联聚丙烯酰胺凝胶都是三维空间网状结构的高分子聚合物。混合物的分离程度主要决定于凝胶颗粒内部微孔的孔径和混合物分子量的分布范围。微孔孔径(ρ)的大小与凝胶物质在凝胶相中的浓度(C)的平方根成反比，而与凝胶聚合物分子的平均直径(d)成正比，它们之间的关系可近似地以下式表示^[15]：

$$\rho = \frac{1.5d}{\sqrt{C}}$$

实验证明，琼脂凝胶的浓度以 8.9% 为宜。

和凝胶孔径大小有直接关系的是凝胶的交联度，凝胶的交联度越高，孔径越小。交联度决定了被排阻物质分子量的下限，移动缓慢的小分子物质，在低交联度的凝胶上不易分离，大分子物质同小分子物质的分离宜用高交联度的凝胶。

凝胶的颗粒粗细与分离效果有直接关系，颗粒细的分离效果好。但流速慢，而粗粒子流速过快会使区带扩散，使洗脱峰变平和宽，因此，要根据工作需要，适当选择颗粒大小及调整流速。为使凝胶颗粒均匀，并除去影响流速的过细颗粒，一般采用自然沉降，再用倾倒法除去悬浮的过细凝胶颗粒。Kawata 等介绍了一种在干燥乙醚中的沉降法，从过细的 Sephadex 中制备适当流速的凝胶部份^[16]。

交联葡聚糖和聚丙烯酰胺凝胶通常的商品为干燥的颗粒，使用前必须充分溶涨，而这个水洗过程在室温下进行缓慢，可用加热 100℃(沸水浴)方法加速溶涨平衡(见表 5-12)。在装柱前，凝胶的溶涨必需彻底，否则由于继续溶涨过程，会逐渐降低流速，影响色谱的均一性，甚至会使色谱柱涨裂。

表 5-12 Sephadex 和 Bio-Gel 的水合作用和平衡时间(小时)

物 质	室 温	100℃ 水浴
Sephadex G-10 G-15	3	1
Sephadex G-25 G-50	6	2
Sephadex G-75	24	3
Sephadex G-100	48	5
Sephadex G-150	72	5
Sephadex G-200	72	5
Bio-Gel P-2-P-10	2—4	
Bio-Gel P-30, P-60	10—12	
Bio-Gel P-100, P-150	24	
Bio-Gel P-200, P-300	48	

(二) 柱的选择及装填

色谱柱一般用玻璃管或有机玻璃管制成，管底部放置玻璃纤维或砂芯滤板(2号或3号)，上面再装上2厘米厚的玻璃球(球径约0.5厘米)，柱顶部联接一个长颈漏斗，长约100厘米，直径约为柱径的一半，漏斗中安装搅拌器。然后在玻璃柱和漏斗中加满水或洗脱剂，

在搅拌下缓缓加入凝胶悬浮液，毛细管出口的流速维持在 5—10 毫升/分。凝胶粒沉积管底后关紧毛细管，使其自然沉积达 1—2 厘米时再打开毛细管，直至达到所需高度为止。拆除漏斗，用较小的滤纸片盖住凝胶床表面，再用大量的水或洗脱剂洗涤过夜。

色谱柱的大小规格的选择也很重要，通常对于高分辨率的柱则采用高的 (L/D 即长度/直径) 比率。例如，Killander 发现分离血清蛋白的柱 L/D 为 23:1 时，效果最佳。为了提高分辨率有人甚至采用 100:1 (L/D) 的比率。增高柱长虽然提高了分辨率，但影响流速和增加了样品的稀释度，所以在实际操作中应通过系统实验来确定色谱柱的大小、规格。

色谱分离效果和装填起来的色谱床是否均匀有大关系，因此使用前必需检查装柱的质量，最简单的方法是用肉眼观察色谱床是否均匀，有没有“纹路”和气泡，或用一种有色的物质的溶液（如铁蛋白液，印度墨水或带色的多糖溶液等），当有色溶液流过色谱柱床后，观察色带的移动，如色带狭窄，均匀平整，说明性能良好，色带出现歪曲，散乱变宽，则必需重新装柱。

(三) 加样及洗脱

分子筛色谱中由于其洗脱曲线是分配等温线，溶质的浓度与分配等温线无关，故对比许多其他的色谱法，溶质可采用较高的起始浓度，但也不要太高，浓度太高粘度太大，一般溶质的粘度不能超过溶剂的两倍。

对于高分辨率的分子筛色谱，开始溶液的体积主要为内体积 (V_i) 所决定，故高得水值凝胶（如 Sephadex G-200），每毫升总床体积 (V_t) 可加 0.3—0.5 毫克溶质，使用体积约为 $0.02 V_t$ ，而低得水值凝胶（如 Sephadex G-75）每毫升总体积 (V_t) 加溶质量 0.2 毫克，样品体积为 $0.01 V_t$ 。

样品上柱也是分子筛色谱的一项重要操作，要求尽可能保持色谱床表面的稳定，可用人工方法，当色谱柱经平衡后，吸去上层液体，待平衡液流至床表面以下 1—2 毫米时，关闭出口，以最小体积样品用滴管慢慢加入，打开出口，调整流速，使样品慢慢渗入色谱床内，当样品加完流至快干时，小心加入洗脱液洗脱。加样品的体积越小，分离效果越好，上样体积不得超过 $V_t(K_d'' - K_d')$ 。

非水溶性物质的洗脱都采用有机溶剂（如苯和丙酮等），水溶性物质的洗脱一般采用水或具有不同离子强度和 pH 值的缓冲液，pH 的影响与被分离物质的酸碱度有关，在酸性 pH 值时，碱性物质易于洗脱，在碱性 pH 值时，酸性物质易洗脱。多糖类物质的洗脱以水为最佳。有时为了使样品增加溶解度而使用含盐洗脱剂，盐类的另一个作用是抑制交联葡聚糖和琼脂糖凝胶的吸附性质。

某些物质洗脱剂的选择实例见表 5-13。

(四) 凝胶柱的保养

交联葡聚糖和琼脂糖都是多糖类物质，极易染菌，由微生物分泌的酶能水解多糖的糖苷键，聚丙烯酰胺凝胶虽不是微生物的生长介质，但其溶涨的悬浮液内也常染菌而改变色谱特性。为了抑制微生物的生长，磷酸离子和所有底物必需在凝胶床保存之前完全除去，将柱真空保存或低温保存，但温度不可过低，介质的离子强度要高一些，以防冻结。

表 5-13 某些物质的洗脱剂

分离物质	凝胶	洗脱剂
多肽,氨基酸	Sephadex G-25	乙酸:吡啶:水=65:15:25
血红蛋白, 血清白蛋白	7% 琼脂	0.07M 磷酸盐缓冲液 pH 7.2
球蛋白类	Sephadex G-25	0.15M 磷酸盐缓冲液 pH 8.0
藻青蛋白, 藻红蛋白	Sephadex G-75	0.1M 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液 pH 7.0
蛋白质类	9% 琼脂	0.04M 磷酸钾-0.12M KCl 缓冲液 pH 7.0
染料结合蛋白	Sephadex G-25	0.1M 磷酸盐缓冲液 pH 7.0
虫漆酶, 碳酸酐酶	交联聚丙烯酰胺	0.05M 磷酸盐缓冲液 pH 8.0
胃蛋白酶	Sephadex G-50	0.2M 乙酸钠 pH 4.9
酸性磷酸酯酶	Sephadex G-75	1M 乙酸
葡聚糖	9% 琼脂	水
甲状腺激素	Sephadex G-50	0.2M 乙酸-乙酸铵缓冲液 pH 4.72
雌性激素	Sephadex G-25	0.1M NH ₄ OH
烟草花叶病毒	8% 琼脂	0.2M NaH ₂ PO ₄ -0.3M NaCl pH 6.8
维生素 B ₁	Sephadex G-25	水
牛乳中的镁	Sephadex G-50	0.5M 磷酸缓冲液 pH 7.4
聚苯乙烯	硅酸	苯
酚, 脂等	聚丁二烯苯	丙酮, 乙酸, 乙酯

常用的方法是在凝胶中加入一些抑菌剂, 如叠氮钠(0.02%); 三氯丁醇(0.01—0.02%); 乙基汞硫代水杨酸钠(0.005—0.01%); 苯基汞代盐(包括苯基汞代乙酸盐、硝酸盐、硼酸盐)(0.001—0.01%)。

(五) 凝胶的再生和干燥

凝胶色谱的载体不会与溶质发生任何作用, 因此色谱分离后稍加平衡即可进行下一次色谱。但在实际操作中常有一些污染凝胶或色谱床表面, 必需作适当处理。交联葡聚糖凝胶柱可用 0.2N NaOH 和 0.5N NaCl 的混合液处理, 聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶由于遇酸碱不稳定, 常用 0.5N NaOH 处理。

经常使用的凝胶以湿态保存为主, 只要在其中加入适当的抑菌剂就可放置几个月至一年, 不需要干燥, 尤其是琼脂糖凝胶, 干燥操作比较麻烦, 干燥后又不易溶涨, 一般都以湿法保存。如需进行干燥时应先将凝胶按一般再生处理彻底浮选, 除去碎颗粒, 以大量水洗涤除杂质, 然后用逐步提高乙醇浓度的方法使之脱水皱缩, 方法是先用 70% 乙醇, 接着是 90% 乙醇, 最后为 95% 乙醇逐步脱水, 然后在 60—80℃ 下干燥或用乙醚洗涤干燥。

四、分子筛色谱的应用

(一) 脱盐

生物大分子物质(如蛋白质、核酸、酶、多糖等)在分离提纯时, 常用盐溶液洗脱, 故洗脱液含有无机盐, 一般采用透析法除盐, 费时又繁琐, 如果采用分子筛层析法除盐, 时间短、也不影响生物大分子的生物特性。葡聚糖凝胶 G-25 因其流动阻力小, 交联度适宜, 故常用于蛋白质溶液的脱盐, 一般要达到完全脱盐, 溶液的体积应在 0.8V_f 以下, 如果样品粘度不大, 0.75V_f 可达到完全脱盐, 但在一般情况下, 采用 0.3V_f 左右体积即可^[17]。

进行蛋白质样品的脱盐应注意蛋白质溶液在去除电解质后因溶解度显著下降而沉淀，以致被吸附在柱上不能洗脱下来，解决的方法是先使用含有挥发性盐类（如甲酸铵、醋酸铵等缓冲液）使色谱柱平衡，然后加入样品，并用同种缓冲液洗脱，洗脱液再用冷冻干燥法除去挥发性盐类。

（二）分子量的测定

用一系列已知分子量的标准样品放入同一凝胶色谱柱内，令其在同一条件下进行凝胶色谱分离，记下每一种成分的洗脱体积，并以洗脱体积对分子量的对数作图，在一定分子量范围内可得一直线，这就是分子量的标准曲线（图 5-11）^[18,19]。测定未知物的分子量时，可将样品加在测定了标准曲线的凝胶柱内，洗脱后根据此物质的洗脱体积，可在标准曲线上查出它的分子量。用本法测定高分子物质的分子量时不需要复杂的仪器设备，操作简便，样品用量少，有一定的实用价值，但本法也会产生一定的偏差，如对一些纤维状蛋白质，糖蛋白等，因此要作精确的测定，要和其他方法结合比较。

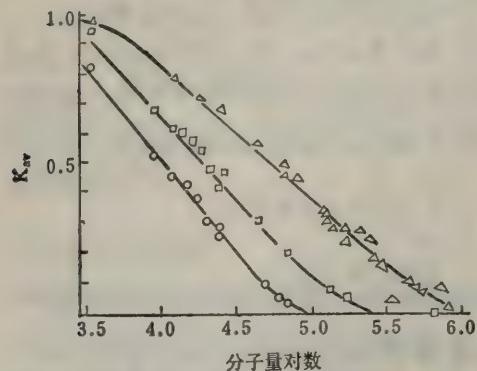


图 5-11 溶质的洗脱特征和分子量之间的相互关系

——△—△—，交联葡聚糖 G-200；
——□—□—，交联葡聚糖 G-100；
——○—○—，交联葡聚糖 G-75；

John 等^[20]用微孔聚丙烯酰胺凝胶 P-2 分离葡萄糖寡聚糖 ($n = 11$)，采用色谱柱 127×1.5 厘米，凝胶小于 400 目，在 65°C 用水洗脱，流速 28 毫升/小时，得到良好的分离结果（图 5-12）。

Laurent & Granath^[21] 研究了在 Sephadex G-200 上可溶性葡聚糖的一系列色谱特性。

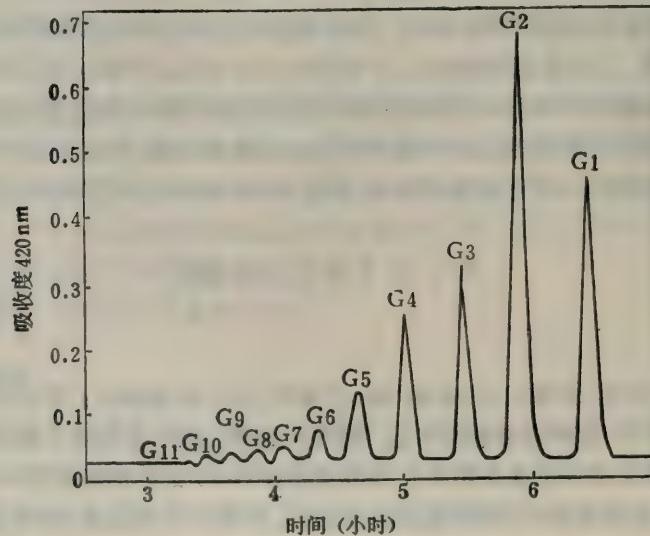


图 5-12 在 Bio-Gel P-2 上葡萄糖寡聚糖的分离图

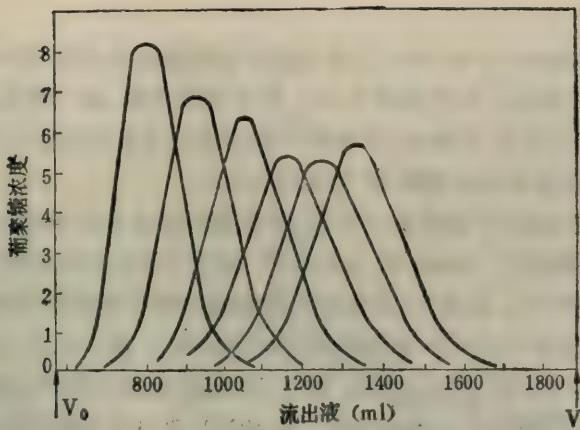


图 5-13 在 Sephadex G-200 上可溶性葡聚糖的分离图

葡聚糖的分子量从 13,600 (组份 D-6) 到 59,000 (组份 D-1) 用 92×5.1 厘米凝胶床, 以 $0.2 M$ NaCl 洗脱, 流速 1.5 毫升/小时·厘米²。分离结果如图 5-13。

2. 核酸及其衍生物 用分子筛色谱法研究核酸及其衍生物的分级分离首要问题是选择一个适当的固定相。在 Sephadex G-100 或 G-200 或相应的聚丙烯酰胺凝胶上都可满意地分离转移 RNA (4S. 分子量约 25,000—28,000) 和 5S 核糖体 RNA, 但对于核糖体 16S 和 23S 及信使 RNA 的分离, 则需要较大孔的基质 (如琼脂糖)。这可能是由于核酸和具相同分子量的球蛋白比较有较大的分子体积, 例如: Hayes & Mitchell^[22] 发现一个合成的寡聚脱氧核苷酸 (分子量为 25,000) 在琼脂糖柱上其 V_e/V_0 值为 1.29, 而在同样柱上对 α -糜蛋白酶 (分子量 22,500), 其 V_e/V_0 值为 2.29, 这个区别意味着寡聚脱氧核苷酸有比蛋白质大的斯托克 (stoke) 半径, 这是因为核酸链中相邻的离子化磷酸基之间的静电排斥结果。增加洗脱液的离子强度可以降低静电效应, 使分子更紧密, 从而降低这种排

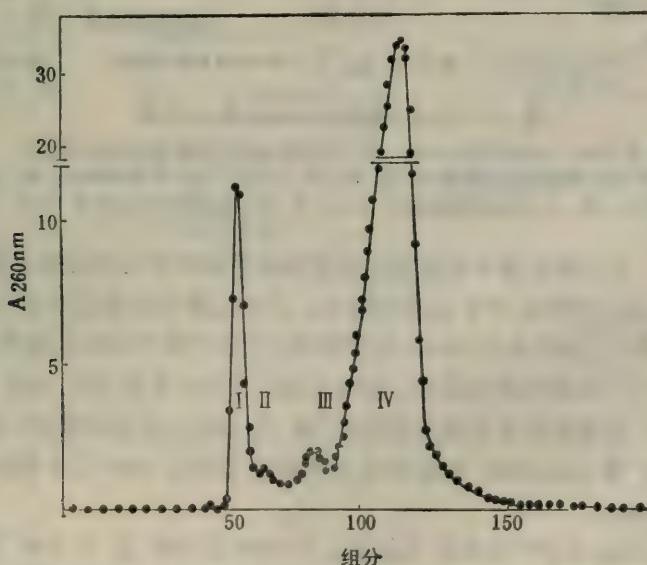


图 5-14 在 Sephadex G-100 上大肠杆菌细胞的 RNA 的分级分离

斥力。

Reynier 等^[23]用 Sephadex G-100 分离大肠杆菌细胞抽提液的 RNA，色谱柱 187×3 厘米，以 $0.05 M$ NaCl 洗脱，得色谱图 5-14。显示有四个峰，第一峰出现在色谱柱的外水体积中，含核糖体 16S 和 23S RNA，II 峰含一些中等分子量的代谢上稳定的 RNA 的混合物，峰 III 是 5S 核糖体 RNA，而峰 IV 为转移 RNA。

对于分子量超过 500,000 的溶质的分离，特别是对那些有展开结构的分子，需要大孔隙的固定相（如琼脂糖珠）。Oberg 和 philison^[24] 测定了细胞和病毒的核酸在几种不同的琼脂糖浓度上的色谱行为，如图 5-15 所示为细胞的核酸和脊髓灰质炎病毒 RNA 的合成混合物在 60×2.1 厘米柱的 1% 琼脂糖珠上分离结果。峰 I 仅含 DNA，峰 II 含病毒 RNA；峰 III 和 IV 各为核糖体和 tRNA，图 5-15 表示分离过程中琼脂糖浓度变化的影响，DNA 在所用的琼脂糖浓度下都被排阻，而 tRNA 在 4% 琼脂糖浓度的 K_d 值为 0.6，在 1% 琼脂糖浓度中则上升到 1.0，洗脱液 pH 在 5—8 范围内变化对分离影响很小，NaCl 浓度从 0.01 到 1.0 M 的变化不影响 DNA 或 tRNA 的色谱行为。由此看出 DNA 完全为固定相所排阻，而 tRNA 有一个紧密的构型，核糖体（16S 和 23S）和腺病毒 RNA 由于 NaCl 浓度的增加而降低了静电排斥，从而形成更紧密的构型，故在柱上有更大的阻留。图 5-15 (c) 表示腺病毒型 5 DNA (分子量 20×10^6)，脊髓灰质炎病毒 RNA (分子量 370,000) 和随体烟草坏疽病毒 RNA (分子量 370,000) 在 1% 琼脂糖珠上的分离结果，色谱柱长 60 厘米。

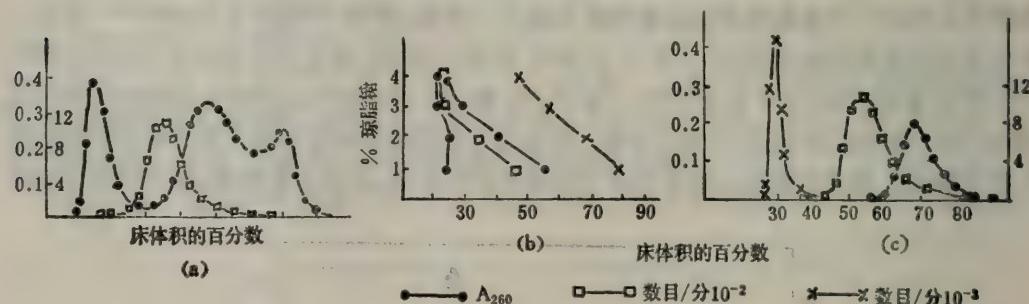


图 5-15 高分子量核酸在琼脂糖珠上的分离

(a) 脊髓灰质炎病毒 RNA 与细胞核酸分离；(b) 琼脂糖浓度对核酸洗脱体积的影响，●—● DNA，○—○ rRNA，□—□ 脊髓灰质炎病毒 RNA，×—× tRNA；(c) 病毒核酸的分离，×—× 腺病毒 RNA，□—□ 脊髓灰质炎病毒 RNA，●—● 随体烟草坏疽病毒 RNA

3. 蛋白质 分子筛色谱早期重要的应用是血清蛋白的分级分离。按分子大小可分为三组。第一组 (A) 包括约 50% 总血清蛋白，其中主要为白蛋白 (分子量 70,000)，较少量的 ρ -1 前白蛋白 (分子量 61,000)，血清粘蛋白 (分子量 54,000)，铁传递蛋白 (分子量 60,000)；第二组 (G) 包括免疫球蛋白，主要为 IgG 及较少量的 IgA、IgD 和 IgE (分子量 15,000—170,000)，少量的血浆铜蓝蛋白 (分子量 151,000)、结合珠蛋白 (分子量 200,000) 和 β -2A 球蛋白；第三组 (M) 包括免疫巨球蛋白 (IgM) 和 α 及 β 脂蛋白 (分子量约 2,000,000—3,000,000)。

图 5-16 (a)、(b)、(c)^[25] 表示在 Sephadex G-100、G-150 及 G-200 上这些组别的分离图谱。分离结果最好为 G-200，在聚丙烯酰胺球上则以 6×5 的孔径上分辨率最佳 [图

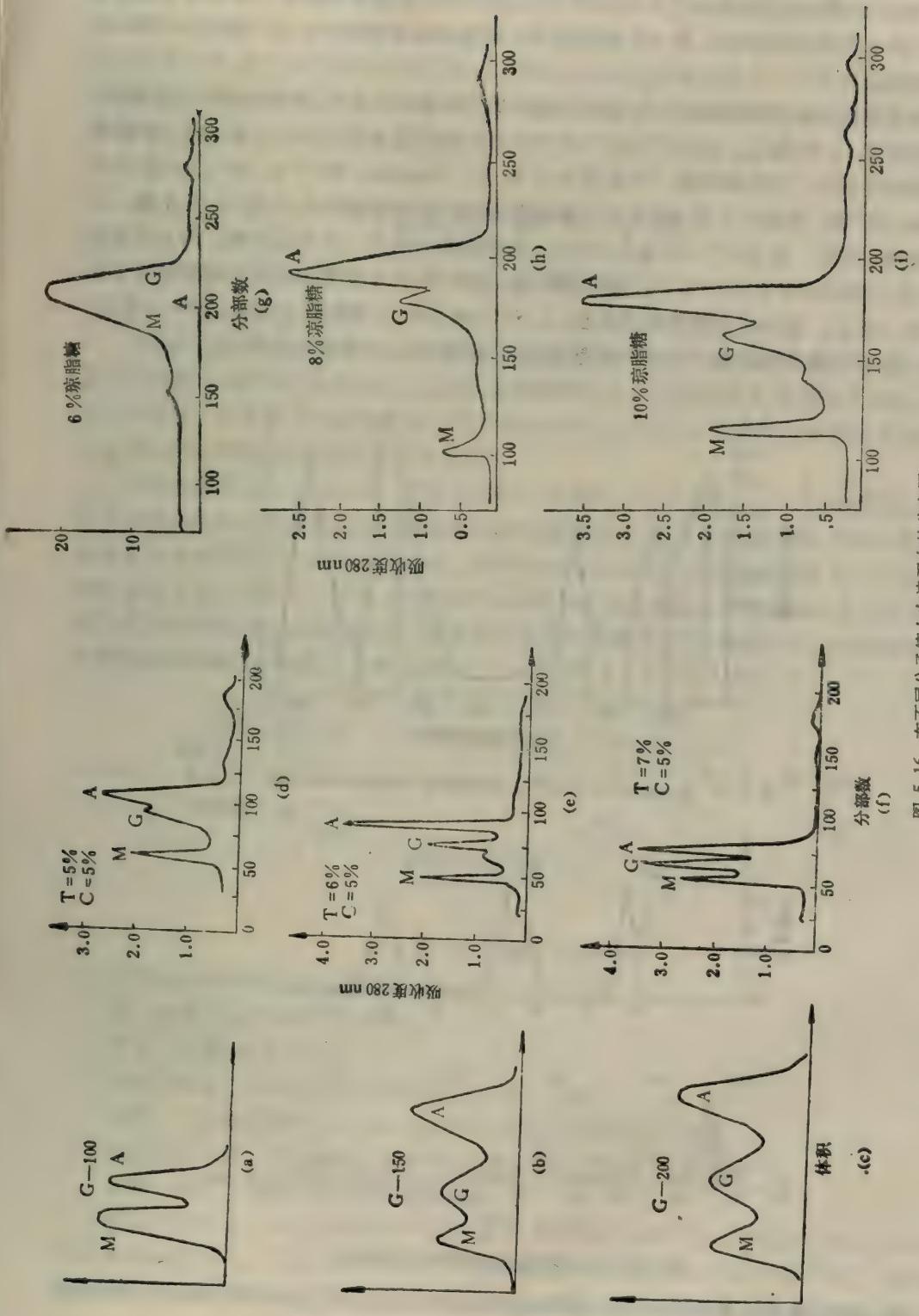


图 5-16 在不同分子筛上血清蛋白的分离图
 (a)、(b)、(c): 在 Sephadex 上; (d)、(e)、(f): 在聚丙烯酰胺凝胶上; (g)、(h)、(i): 在琼脂糖胶上
 M = 白蛋白, G = 球蛋白, A = 蛋白白

5-16(d)、(e)、(f)], 但巨球蛋白组份的分辨率最好为 5×5 的凝胶。蛋白质的分子量在200,000之下的在琼脂糖凝胶上分离效果不好, 但10%的琼脂糖浓度可以用来分离巨球蛋白[5-16(G)、(H)、(I)], 而6%凝胶仅用于分离如病毒的颗粒, 分子量在300,000以上的物质。

对于分析分离的实验最好在柱直径1厘米长200厘米下进行, 床体积80—300毫升, 最大加样量5—50毫克, 这对于大分子溶质的混合物的分离有良好的分辨力。假如适当选择操作条件, 在制备范围上可获得高分辨力, Mauritz等^[26]在 300×7.6 厘米的Sephadex G-100色谱柱上对0.5克小牛胸腺组蛋白的富有精氨酸组份的分级分离, 以0.01M HCl洗脱, 流速67—90毫升/小时。分离结果如图5-17得五个峰, 按9个组分收集, 蛋白质回收率达到85%, 组蛋白在峰III, 而峰IV和V在聚丙烯酰胺凝胶电泳上实际上均一组分。假如应用特制的双头柱, L/D 比率(40:1)控制适当流速, 1.5—2毫升/小时·厘米²。较低加样量(少于0.04毫克/毫升床体积), 可得良好分辨力。

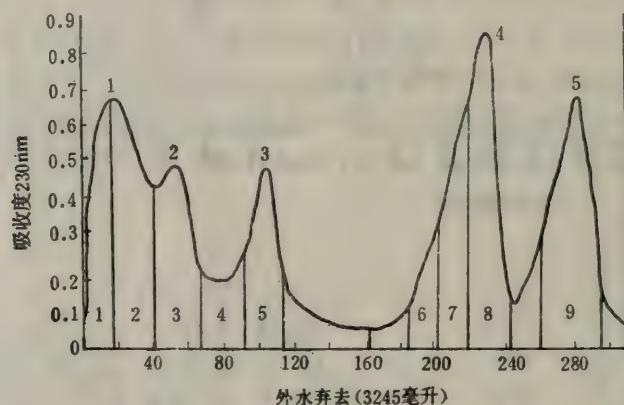


图 5-17 在 Sephadex G-100 上富有精氨酸-组蛋白的分级分离

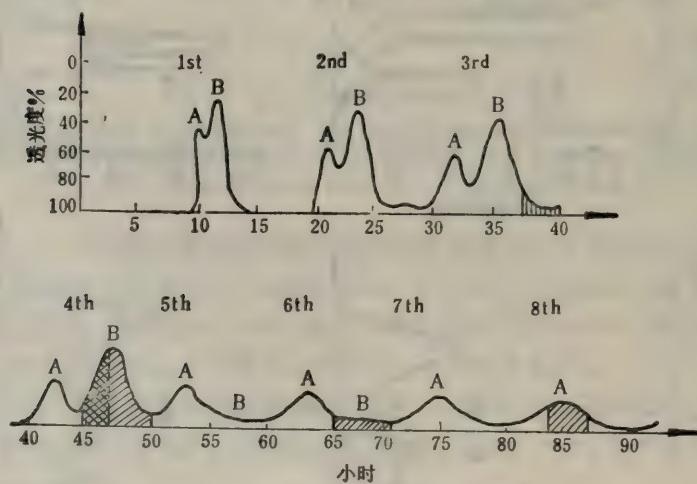


图 5-18 人血浆铜蓝蛋白的循环分子筛色谱

以上的色谱操作多采用长的柱, 故柱的装填及操作较繁琐, 但在许多情况下, 可用一

根短柱，以循环色谱法代替。例如 Porath 和 Bennich^[27] 报导的人血浆铜蓝蛋白的分级分离(图 5-18)。用粗血浆铜蓝蛋白 156 毫克，93 × 2.2 厘米色谱柱，Sephadex G-100，以 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 循环上柱，流速 20 毫升/小时。在三次循环后得到 A 和 B 成分的不完全分离，进一步的循环色谱可除去 B 峰的尾随物质(阴影部分)；至第四循环时 A 部分已与任何残余 B 部分分开；至第六和第八循环之间，某些尾随物质已除去；到第八循环可得纯 A 组分。

第三节 亲和色谱

一、基本原理

生物体中许多高分子化合物具有和某些相对应的专一分子可逆结合的特性，例如酶蛋白和辅酶、抗原和抗体、激素及其受体、核糖核酸与其互补的脱氧核糖核酸等体系，都具有这种特性。生物分子间的这种结合能力称为亲和力，根据生物分子间亲和吸附和解离的原理，而建立的色谱法称为亲和色谱法。

亲和色谱的基本过程如下：把欲分离的可亲和的一对分子的一方作为配基 (ligand)，在不伤害其生物功能情况下与不溶性载体结合使固定化，装入色谱柱(称亲和柱)，然后把含有欲分离物质的混合液作为流动相，在有利于配基固定相和欲分离物质之间形成络合物的条件下进入亲和柱。这时，混合物中只有能与配基形成络合物的物质分子被吸附，不能形成络合物的杂质则直接流出。变换通过亲和柱的溶液，促使配基与其亲和物解离，从而释放出亲和物来(如图 5-19)。

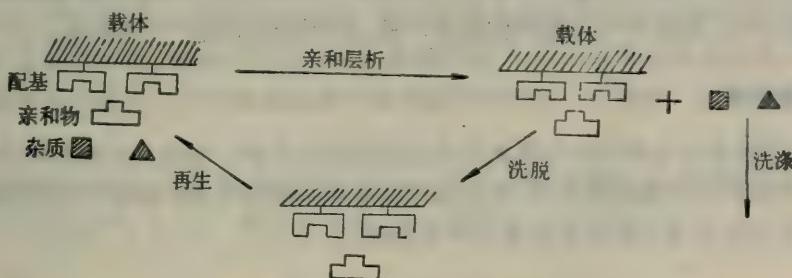


图 5-19 亲和色谱基本过程示意图

亲和色谱中最常用的生物体系如下：

酶：基质类似物，抑制剂，辅酶。

抗体：抗原，病毒，细胞。

外源凝集素：多糖，糖蛋白，细胞表面受体，细胞。

核酸：互补碱基序列，组蛋白，核酸聚合酶，结合蛋白。

激素及维生素：受体，载体蛋白。

细胞：细胞表面特异蛋白、外源凝集素。

亲和色谱的优点是在温和条件下操作简单，效率高，特别对分离含量极少而又不稳定的活性物质最有效。甚至从粗抽提液中经亲和色谱一步就能提纯几百至几千倍。例如分离胰岛素受体时，把胰岛素作为配基，偶联于琼脂糖载体上，经亲和色谱，从肝细胞抽提液

中纯化达 8000 倍。

亲和色谱的局限性在于不是任何生物高分子都有特定的配基，针对某一分离对象就需要制备专一的配基和选择特定的色谱条件。

由于琼脂糖这一理想载体的出现以及固定化技术的改进，使亲和色谱技术得到越来越广泛的应用，发展十分迅速，目前已有几百成功的例子，也有了作为亲和色谱载体的商品供应。因此，亲和色谱技术已成为生物化学中分离提纯生物活性物质的重要方法之一^[28, 29]。

二、载体的选择

亲和色谱的理想载体应具备下列特性：(1) 不溶性；(2) 渗透性：疏松网状结构，容许大分子自由通过；(3) 高硬度及适当的颗粒形式(最好为均一的珠状)；(4) 最低的吸附力；(5) 较好的化学稳定性；(6) 抗微生物和酶的侵蚀；(7) 亲水性；(8) 具大量的供反应的化学基团可供活化，能与大量配基共价连接。

(一) 纤维素

亲水性纤维素衍生物已用于抗体和酶的纯化。Lerman 最早用于酪氨酸酶的分离，将酪氨酸的抑制剂对苯重氮酚连接于纤维素上，用来提纯蘑菇中的酪氨酸酶^[30]；黄素衍生物偶联于羧甲基纤维素上，能特异吸附肝黄素激酶，使酶纯化几百倍^[31]。纤维素衍生物用于核苷酸化学上特别有效，例如，用于纯化核酸的互补链转移 RNA 和核苷酸。

虽然纤维素衍生物有价廉及来源充足的优点，但由于它的纤维性和非均一性限制了大分子的掺入^[32]。而且非专一吸附作用较严重，因而限制了其广泛的应用。

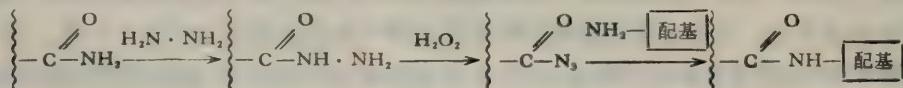
(二) 葡聚糖凝胶

葡聚糖凝胶是由葡聚糖经环氧氯丙烷交联而成的产物，它有良好的化学及物理稳定性，但多孔性则较琼脂糖凝胶为低，并且经过偶联配基的操作后，凝胶的膨胀度将进一步缩减，因而在亲和色谱中的应用也受到一定限制。

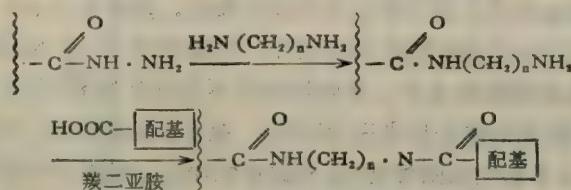
(三) 聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺凝胶的物理化学性质也十分稳定，抗微生物侵蚀的能力比琼脂糖强，有更多的可供化学反应的酰胺基，提高了配基的浓度，故特别适用于配基和亲和物之间亲和力比较弱的系统。用 Biogel 制得配基高度取代的衍生物，就能增强物质间的相互作用而成功地进行亲和色谱。从聚丙烯酰胺凝胶为载体可制得各种衍生物。

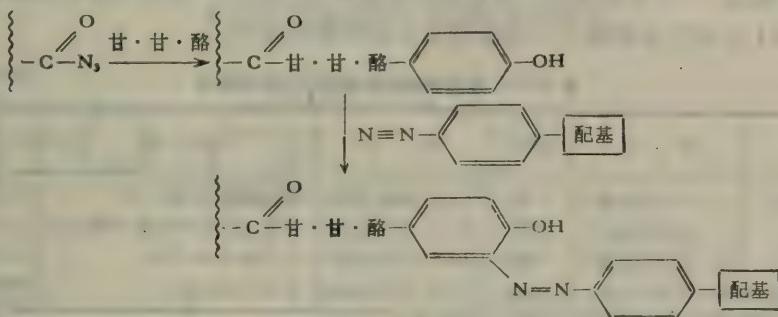
1. 叠氮衍生物 通过聚丙烯酰胺的酰胺基经水合肼处理后形成酰肼基，再由亚硝酸处理而成叠氮衍生物。它可以和具有脂族或芳香族氨基的配基偶合（以 { 表示聚丙烯酰胺）。



2. 氨基衍生物 带有酰胺基的聚丙烯酰胺衍生物可与脂族二胺反应制得氨基衍生物。它可以和带羧基的配基偶联。利用脂族二胺中的烃长度可以控制“手臂”的长短。



3. 酪氨酸衍生物 聚丙烯酰胺叠氮衍生物进一步和甘氨酰酪氨酸反应可制得酪氨酸衍生物,它可以和带有氨基的配基经重氮化后相偶联。



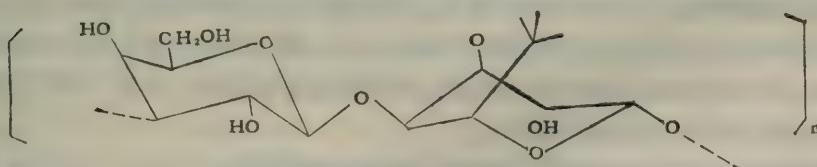
(四) 多孔玻璃

多孔玻璃的优点在于不受微生物的侵蚀,经受得起有机溶剂和缓冲液组成的改变。但是玻璃表面由于含有羟基,因而在水溶液中显示轻微负性的表面电荷,对于大多数酸性蛋白质、病毒、多糖或核酸,洗脱时没有任何阻挡或吸附,而对所有强碱性蛋白质和一些中性蛋白质及病毒都可吸附。多孔玻璃表面对蛋白质这种非专一性吸附,也影响了其广泛应用。

烷基胺取代的多孔玻璃(商品名 Bio-Glass) 共价连接甘氨酰-D-苯丙氨酸,制得羧肽酶 A 的亲和吸附剂^[33], NAD⁺ 偶联于 Bio-Glass 制得水不溶辅酶^[34]。

(五) 琼脂糖

琼脂糖是 D-半乳糖和 3,6-脱水-L-半乳糖交替结合的链状多糖。



商品中相当于 2, 4 和 6% 的琼脂糖浓度的珠状凝胶, 分别称为 Sepharose 2B、4B 和 6B。凝胶浓度越低, 其结构也越疏松, 即多孔性越高, 其机械强度则随浓度的降低而减少。

琼脂糖易溶于沸水中，在40℃以下即形成不溶性凝胶（甚至浓度低于0.4%）。与葡聚糖和聚丙烯酰胺相反，其多聚链是由氢键连接一起的而不是由共价键连接的，这就使琼脂糖凝胶在化学上的稳定性比葡聚糖和聚丙烯酰胺差，要避免在pH低于4高于9下操作。破坏氢键的试剂能降低凝胶的机械稳定性。但通常用0.1M NaOH或1M HCl处理2—3小时不致引起凝胶颗粒的变化。琼脂糖凝胶不为有机溶剂（如乙醇、丙酮）所破坏，而葡聚糖和聚丙烯酰胺用丙酮处理则完全收缩。经6M盐酸胍或7M尿素长期处理，只引起凝胶略微缩小，而不影响吸附性能，这种稳定性保证了吸附剂可反复使用，并可采用蛋白变性剂作为洗脱大分子及彻底洗涤吸附剂的手段。

由于琼脂糖凝胶是一种热可逆凝胶，凝胶受热即失去稳定性，最后溶解。因此，凝胶必需保存在低温下，但不能冻结，因为冻结也破坏可逆结构。凝胶不能加热消毒，宜湿态储存，表5-14总结了琼脂糖对一些溶剂和介质的耐受条件。

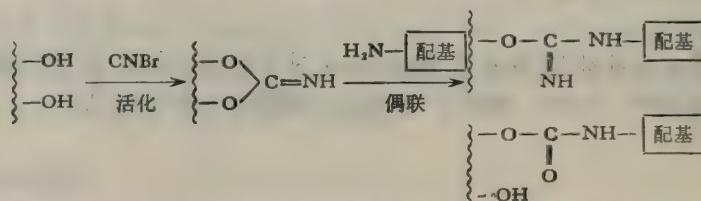
表 5-14 琼脂糖耐受的溶剂和介质的条件

溶剂	条件	溶剂	条件	溶剂	条件
0.1M NaOH	2—3小时(室温)	乙醇	2—3 小时(室温)	有水吡啶 80% V/V	2—3小时(室温)
1M HCl	2—3小时(室温)	甲醇	2—3 小时(室温)	有水二甲基甲酰胺 50% V/V	2—3小时(室温)
6M 盐酸胍	2—3小时(室温)	丁醇	2—3 小时(室温)	乙二醇 50% V/V	2—3小时(室温)
7M 尿素	2—3小时(室温)	丙酮	2—3 小时(室温)	无水二氯六环	6个月

三、琼脂糖的活化及其衍生物的制备

生物工程学

琼脂糖使用前需活化，通常是在碱性条件下用溴化氰处理引入“亚氨基碳酸盐”，再在弱碱的条件下直接偶联含有游离的脂族或芳香族氨基的配基，形成氨基碳酸盐和异脲衍生物。



由于亲和色谱中常用一些小分子化合物作为配基制备亲和吸附剂，但小分子的配基直接连接于琼脂糖上常产生无效吸附剂，其原因是由于载体的空间位阻关系，使大分子化合物（亲和物）不能直接接触到配基（如图5-20）。解决的办法是在载体和配基之间引入适当长度的“手臂”减少载体的空间位阻，增加配基的活动度。作为“手臂”的烃链可以先连接于载体，再通过它连接于配基上。

图5-21表示纯化 β -半乳糖苷酶的几种琼脂糖吸附剂。*E. coli* β -半乳糖苷酶的竞争性抑制剂对氨基苯- β -D-巯基吡喃半乳糖是相当弱的抑制剂，直接连于琼脂糖上的衍生物不能用来纯化 β -半乳糖苷酶（图5-21A），而在抑制剂和载体之间引入“手臂”，在溴乙酰氨基乙基琼脂糖上（图5-21B）和琥珀酰化的3,3'-二氨基二丙胺琼脂糖（图5-21C）上连

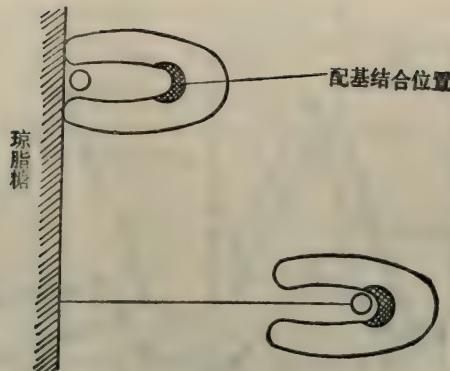


图 5-20 亲和色谱中引入“手臂”原因示意图

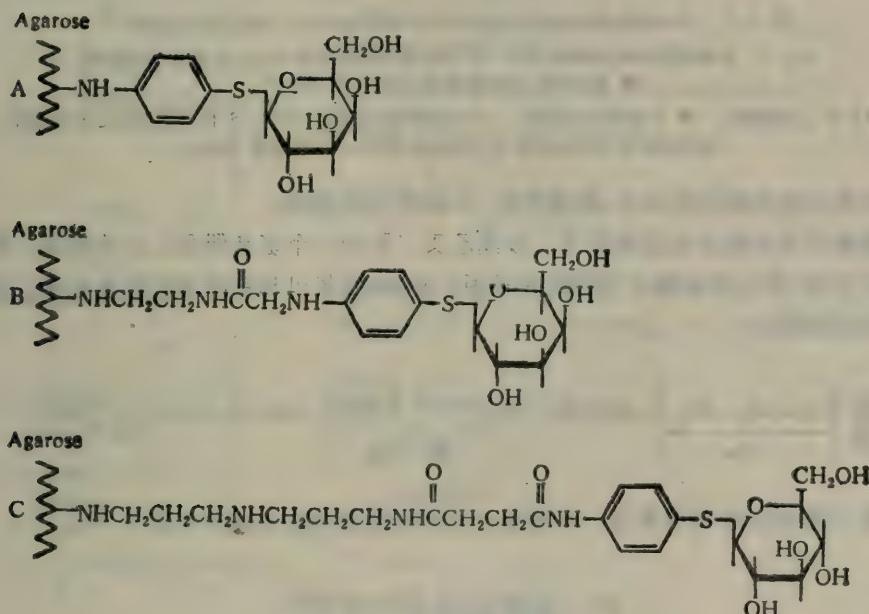


图 5-21 纯化 β -半乳糖苷酶的几种琼脂糖吸附剂^[33]

接抑制剂，发现 B 衍生物（手臂长度 $\sim 10\text{ \AA}$ ）与衍生物 A 有本质上的差别， β -半乳糖苷酶的洗脱峰在柱色谱图上比杂蛋白峰的迁移稍迟缓，而衍生物 C（手臂长度约 21 \AA ）则对 β -半乳糖苷酶有很强的亲和力。

图 5-22 表示几种激酶和脱氢酶与琼脂糖衍生物（含有不同长度的次甲基手臂连接的 ATP 和 NAD^+ ）的相互作用。在同一实验条件下研究它们之间亲和力的大小关系，从而得出以下重要结论。当伸长手臂含有四个次甲基时，核苷酸与载体骨架很接近，($0-5\text{ \AA}$) 酶和亲和吸附剂的结合力很弱，接近于零，而当伸长“手臂”达到 $5-10\text{ \AA}$ (即次甲基增加到 8 个) 时，其结合力有很大的增加，故需较高的盐浓度才能把结合的酶从柱上洗脱下来，但当载体和配基之间的“手臂”含有 8 个以上的次甲基 (长度 $>10\text{ \AA}$) 时，酶和亲和吸附剂之间的结合力反而下降，这可能是由于“手臂”过长易弯曲，使配基过于接近载体骨架，从而减弱了与酶的作用。

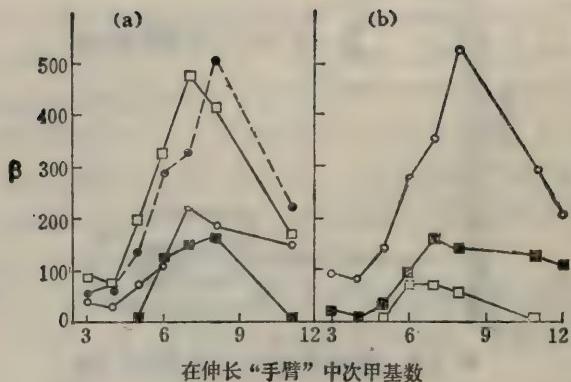
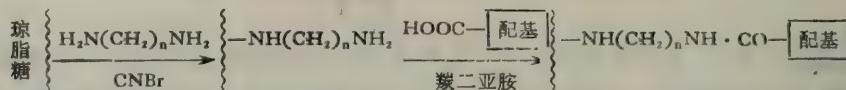


图 5-22 某些脱氢酶和激酶与固定化核苷酸结合时伸长手臂长度的影响^[36]
(a) □ 兔骨髓肌乳酸脱氢酶 M₄; ● 猪心肌乳酸脱氢酶 H₄; ○ 苹果酸脱氢酶;
■ 葡萄糖6-磷酸脱氢酶; 固定化的 NAD⁺。
(b) □ 己糖激酶; ■ 3-磷酸甘油激酶; ○ 甘油激酶; 固定化 ATP, β 代表酶和固定化的核苷酸之间相互作用的强度值及洗脱酶所需的 KCl 浓度 (mM)

在所有的琼脂糖衍生物中,最重要是 ω -氨基琼脂糖。

琼脂糖经溴化氰活化后和甲叉二胺或乙叉二胺的一个氨基偶联。这些脂族二胺分子的烃链的长短,可以控制插入“手臂”的长短,其 ω -氨基可与带羧基的配基在碳二亚胺的作用下脱水连接。



ω -氨基琼脂糖可用来进一步制备一系列的琼脂糖衍生物(如图 5-23)。

四、亲和色谱条件的选择

亲和色谱一般采用柱色谱法。亲和柱的平衡缓冲液的组成、pH 和离子强度应选择亲和物双方作用最强、最有利于形成络合物的条件。一般用接近中性 pH 为亲和吸附条件,上柱的样品液应和亲和柱平衡缓冲液一致。为了有利于络合物的形成,亲和吸附可在 4℃ 下进行,以防止生物大分子的失活,上柱流速尽可能慢。

样品通过亲和柱后,用大量平衡缓冲液洗去杂质,也常用不同的缓冲液洗涤,进一步除去非专一吸附的杂蛋白,尽可能使亲和柱上只留下有专一吸附的亲和物,然后再用洗脱液洗脱亲和物,洗脱液所选取的条件正好与吸附条件相反,应能减弱配基与亲和物之间的亲和力,使络合物完全解离。

由于亲和色谱中亲和对象差异很大,很难有统一的标准,表 5-15 中列举了一些亲和吸附和洗脱条件,以供参考。

洗脱结束后,亲和柱需继续用洗脱剂洗涤至无亲和物存在为止,再用平衡缓冲液使亲和柱充分平衡,存放于冷室(4℃左右)。

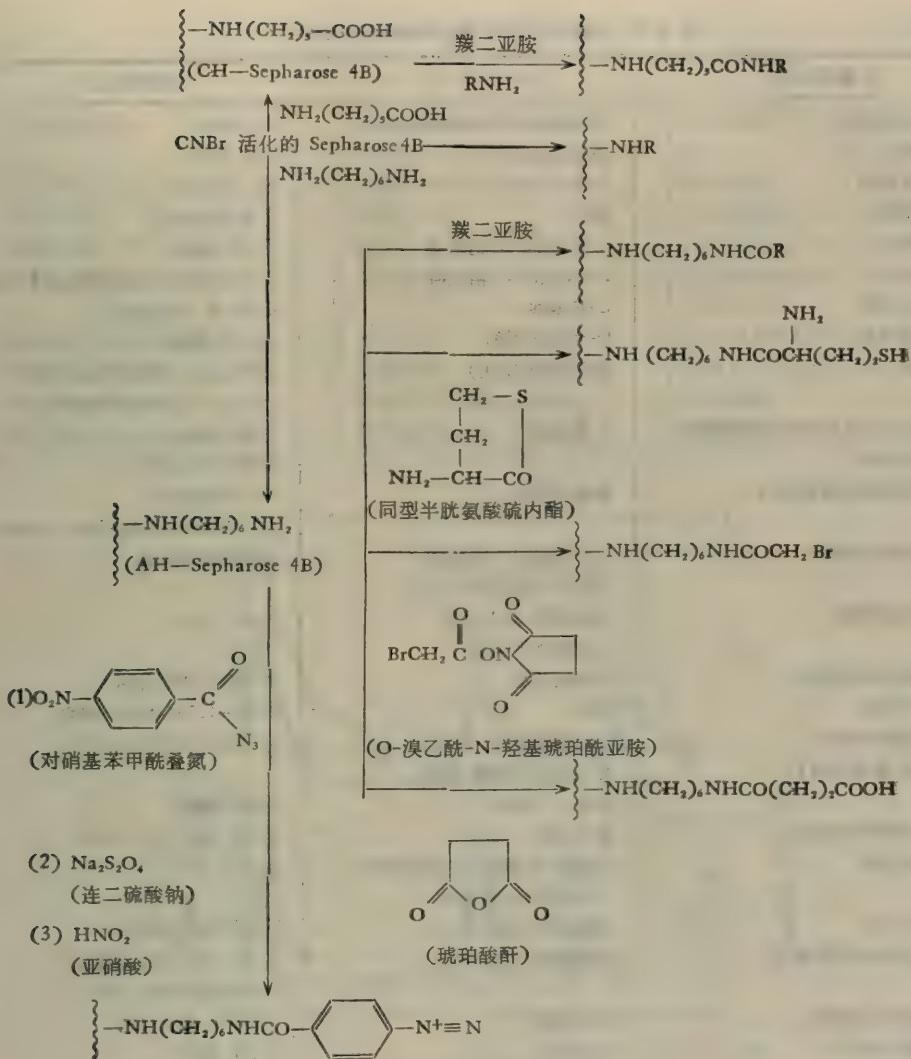


图 5-23 琼脂糖的衍生物

五、亲和色谱应用举例

(一) 醇脱氢酶及磷酸果糖激酶的纯化^[38]

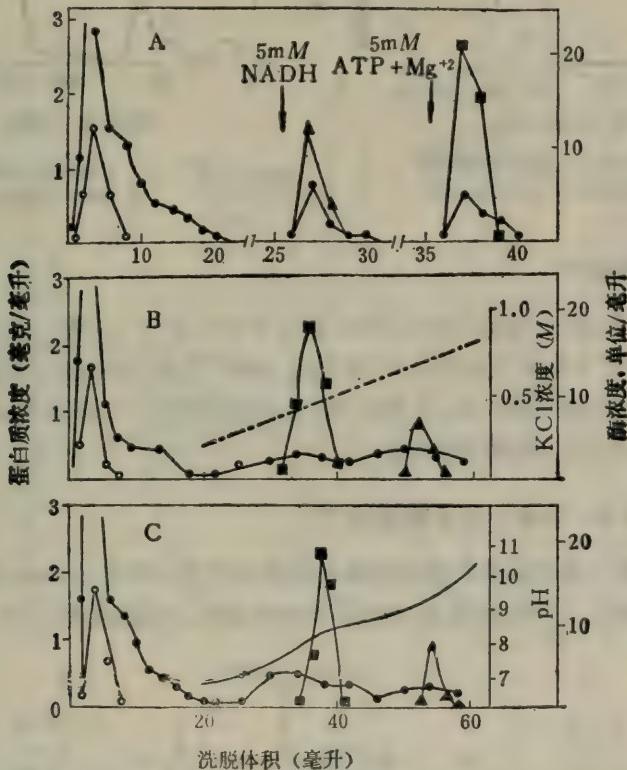
在 N⁶-氨基-5'-AMP-琼脂糖柱上以部分提纯的酶液可纯化醇脱氢酶及磷酸果糖激酶。结果如图 5-24 (A) 0.5 毫升酶抽提液 (每毫升含 40.5 单位的磷酸果糖激酶, 10 单位或 9.9 毫克的醇脱氢酶) 对 10 mM 磷酸盐 (pH 6.8, 含 0.2M KCl) 充分透析, 然后吸附在 AMP-琼脂糖柱上, 用以下溶液顺序洗涤。 (a) 平衡缓冲液 (10 mM 磷酸盐, pH 6.8) 24 毫升; (b) 5 mM NADH 5 毫升 (同上缓冲液); (c) 缓冲液 5 毫升; (d) 5 mM ATP, 5 mM Mg⁺⁺ (在 5 毫升缓冲液中), 流速 0.4 毫升/分。 (B) KCl 梯度处理: 与 (A) 同样条件处理后吸附, 以 10 mM 磷酸盐 (pH 6.8, 含 0.2M KCl) 20 毫升洗涤, 再以 0.2—0.8 M KCl 的线性梯度 (40 毫升)洗脱。 (C) pH 梯度处理: 样品对 10 mM-N-2-羟乙基呱嗪-N'-乙基

表 5-15 亲和色谱中配基的选择和洗脱条件^[37]

亲和对象	配 基	洗 脱 液
乙酰胆碱酯酶	对氨基苯-三甲基氯化铵	1M NaCl
醛缩酶	醛缩酶亚单位	6M 尿素
天冬酰胺酶	D-天冬酰胺	D-天冬酰胺
碳酸酐酶	磺胺	乙酰偶氮酰胺
羧肽酶 A	L-酪氨酸-D-色氨酸	0.1M 醋酸
羧肽酶 B	D-丙氨酸-L-精氨酸	0.05M NaCl, Tris-HCl, pH 7.9
枝酸变位酶	L-色氨酸	0.001M L-色氨酸
α -糜蛋白酶	D-色氨酸甲酯	0.1 M 醋酸
胶原酶	胶原(豚鼠皮肤)	1M NaCl, 0.05M Tris-HCl pH 7.5 0.005M CaCl ₂
3-脱氧-D-阿拉伯糖-庚酮糖酸-7-	L-酪氨酸	0.2M 磷酸盐, pH 6.5
磷酸合成酶	核糖核酸酶	0.001 M CuSO ₄
脱氧核糖核酸酶抑制剂	2,4-二氯-10-甲基蝶酰-L-谷氨酸	0.7 M 盐酸胍 (在 0.5M 醋酸钠-30% 甘油中)
二氢叶酸还原酶	对氨基苯- β -D-巯基吡喃半乳糖苷	5-甲酰四氢叶酸
β -半乳糖苷酶	3-磷酸甘油	NaB, pH 10
3-磷酸甘油脱氢酶	肝素	0.5M 3-磷酸甘油
脂蛋白酯酶	N-(对氨基苯)-草氨酸	0.16-1.5M NaCl 梯度
神经氨酸酶	对氨基苯-磷酸-脱氧胸苷-5'-磷酸	0.1 M NaHCO ₃ , pH 9.1
核酸酶(葡萄球菌)	糜蛋白酶	0.1M 醋酸
糜蛋白酶卵抑制剂	甘氨酸-甘氨酸-(邻苯甲酰-L-酪氨酸-D-精氨酸	0.2M KCl-HCl pH 2
木瓜蛋白酶	对氨基苯-醋酸汞	水
木瓜蛋白酶	聚赖氨酸	0.005 M MgCl ₂
胃蛋白酶, 胃蛋白酶原	L-赖氨酸	0.15-1M NaCl 梯度, (在醋酸钠中) pH 5.2
血纤维蛋白溶酶原	血红蛋白	0.2M E-氨基己酸
蛋白酶(小麦)	对氨基苯-磷酸-尿苷 2'3'-磷酸	0.1M 醋酸
核糖核酸酶 A(胰腺)	核糖核酸酶-S-蛋白质	0.2M 醋酸
核糖核酸酶-S-肽	对氯苯胺	50% 醋酸
凝血酶	吡哆胺-5'-磷酸	1M 苯胺-HCl(在磷酸钠, pH 7 中)
转氨酶	卵粘蛋白	0.25M 谷氨酸, 1M 磷酸盐, pH 4.5
α 和 β 糜蛋白酶	3-吲哚酪氨酸	0.1M 甲酸-0.5MKCl pH 4.5-2.75 梯度
酪氨酸羟化酶	抗血清白蛋白	0.001 M KOH
白蛋白(人)	绒毛膜促性腺激素(人)	0.5M NaCl, 甘氨酸-HCl, pH 2.8
绒毛膜促性腺激素(人)	DNP 卵清蛋白	6M 盐酸胍, pH 3
DNP-蛋白质	β -半乳糖苷酶	0.1M 醋酸
β -半乳糖苷酶	IgE	0.1M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4, 0.01M MgCl ₂
免疫球蛋白 IgE	IgG	0.15 M NaCl, 0.1M 甘氨酸-HCl, pH 3.5
IgG	IgM	5M 盐酸胍
IgM	胰岛素	5M 盐酸胍
胰岛素		0.1 M 醋酸, pH 2.8

续 表

亲和对象	配 基	洗 脱 液
淋巴细胞(鼠)	抗淋巴细胞,球蛋白偶联于 Sepharose 2B 上	0.2M 醋酸
催乳激素(人)	人胎盘催乳激素	4M KSCN
转移 RNA	转移 RNA	0.14M NaCl, 0.01 M 磷酸盐 pH7.4
补体(组分 C ₁)	IgG	0.2 M 二氨基丁烷 pH11.0
皮质醇-结合蛋白(人)	皮质醇	0.08 M 皮质醇, 在 0.05 M 磷酸盐, pH6.8 中
视黄醇-结合蛋白(人)	前白蛋白	水, pH8 (NH ₄ OH)
酪氨酸-结合球蛋白	L-酪氨酸	0.002 M KOH, pH 9.3
抗生素素蛋白	E-N-生物素酰-L-赖氨酸	6M 盐酸胍
胰岛素	抗胰岛素, IgG	6M 盐酸胍

图 5-24 以 N⁶-氨己基-5'-ATP-琼脂糖亲和柱上专一洗脱醇脱氢酶及磷酸果糖激酶

● 蛋白质; ○ 3-磷酸-甘油醛脱氢酶; ▲ 酒脱氢酶; ■ 磷酸果糖激酶

磷酸盐 (pH 6.8) 平衡, 其他条件同 (A), 然后吸附在柱上, 以缓冲液 20 毫升洗涤, pH 梯度 (10 mM 羟乙基呱噪-乙基磺酸盐, 5 mM 甘氨酸-甘氨酸, pH 10.4) 40 毫升洗脱。

(二) α -抗胰蛋白酶的分离纯化^[39]

在伴刀豆球蛋白A-琼脂糖 (ConA-Sepharose) 柱上从人血清中可分离纯化 α -抗胰蛋白酶。

当部分纯化的人血清制剂通过 ConA-Sepharose 柱时，蛋白质出现在外体积中，其中包括大量血清白蛋白，随后用 0.1 M 甲基 α -D-葡萄糖昔洗脱可得 75—80% 的抗胰蛋白酶活性，其中也含有少量的蛋白质（见图 5-25）。

ConA-Sepharose 柱 1.5×10 厘米，以 $0.05 M$ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.6) 平衡，无吸附的蛋白质被洗下。从箭头所指起用 $0.1 M$ 甲基- α -D-葡萄糖吡喃昔（在同上缓冲液中）洗脱，分部收集，流速 15 毫升/小时。

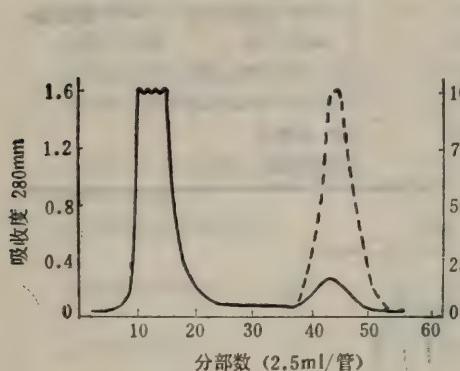


图 5-25 人血清 α -抗胰蛋白酶在固定化-伴刀豆球蛋白 A 上的亲和色谱

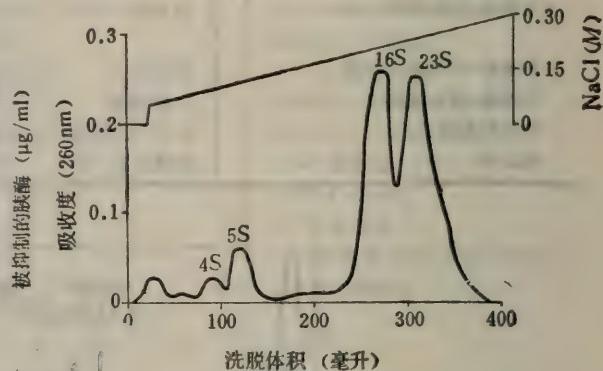


图 5-26 在赖氨酸-琼脂糖 4B 上 rRNA 的色谱

(三) rRNA 的分离^[40]

用赖氨酸-琼脂糖 4B 可把几种 rRNA 按分子大小分开（如图 5-26）。

色谱柱 1.6×7.5 厘米（床体积 15 毫升），流速 15 毫升/小时，温度 22°C ，洗脱液： $0.02 M$ Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 含 $0.01 M$ MgCl_2 以 0.05 — $0.30 M$ NaCl 线性梯度洗脱。样品液： $E. coli$ rRNA（在缓冲液中）。

(四) 还原型辅酶 A (CoA) 的分离纯化^[41]

由于发现藤黄八叠球菌透析的抽提液中的蛋白质绝大部分为 CoA 亲和蛋白，故可直接将此透析抽提液与 CNBr 活化的 Sepharose 6B 反应，制得固相 CoA 亲和蛋白柱 ($1 \times$

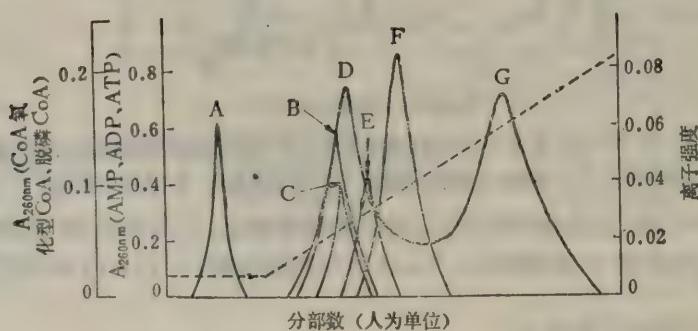


图 5-27 固相 CoA 亲和蛋白柱的吸附专一性
----；离子强度，A: AMP, B: 氧化型 CoA, C: ADP, D: 还原型 CoA,
E: ATP, F: 脱磷 CoA, G: 还原型 CoA

5 厘米), 以醋酸钠 (pH 6.0, 离子强度 0.01) 缓冲液平衡。还原型 CoA 可吸附在柱上, 增加 NaCl 的离子强度可把 CoA 洗脱下来, 如图 5-26, 还原型 CoA 有两个洗脱峰, 洗脱的离子强度各为 0.025 和 0.06, 这说明在吸附剂中至少存在两类 CoA 亲和蛋白, 对 CoA 有不同的亲和力。氧化型 CoA, 脱磷 CoA, ATP 和 ADP 也被吸附, 但 AMP 不吸附。收集的还原型 CoA 纯度达 92—94%。

图 5-27 中表示固相 CoA 亲和蛋白柱的吸附专一性。洗脱的化合物在 260 nm 测光吸收, 第一峰为平衡的缓冲液洗下, 其他峰则以 NaCl 线性梯度洗脱。

(五) 绒毛膜生长激素的提纯^[42]

在抗 HCS-琼脂糖柱上, 以正常人血清提纯人绒毛膜生长激素 (HCS)。以放射免疫测定法测定, 发现在非阻留组分中没有激素, 99% 的激素在胍洗脱液中, 几乎定量回收, 结果如图 5-28。

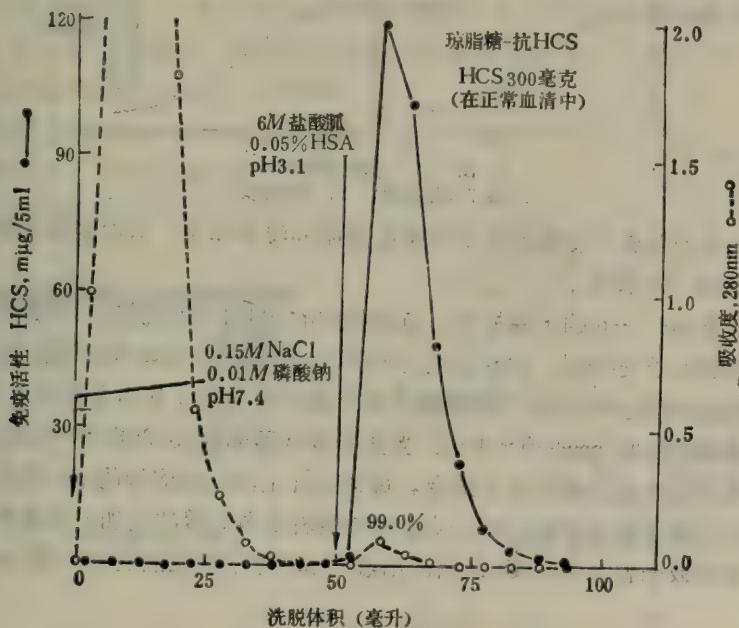


图 5-28

第四节 色谱聚焦

色谱聚焦是 (chromatofocusing) 一种高分辨率的新型的蛋白质纯化技术。Sluyterman 等首先发展了这一技术^[43,44]。它是根据蛋白质等电点, 结合离子交换技术的大容量色谱, 能分离几百毫克蛋白质样品, 洗脱峰被聚焦效应浓缩, 峰宽度可达 0.04—0.05 pH 单位, 分辨率很高, 操作简单, 不需特殊的实验装置。

本法适用任何水溶性的两性分子, 如蛋白、酶、多肽、核酸等。

一、色谱聚焦的原理^[45,46]

(一) pH 梯度的形成

一般的离子交换色谱中, pH 梯度的产生, 通常是利用一个梯度混合器, 例如要得到一个下降的 pH 梯度, 混合容器中盛高 pH 的起始缓冲液, 另一个容器装低 pH 的限制缓冲液 (limit buffer)。当溶液离开混合容器进到柱时, 低 pH 限制缓冲液进入混合容器, 使流入柱上的 pH 逐渐降低 (图 5-29)。

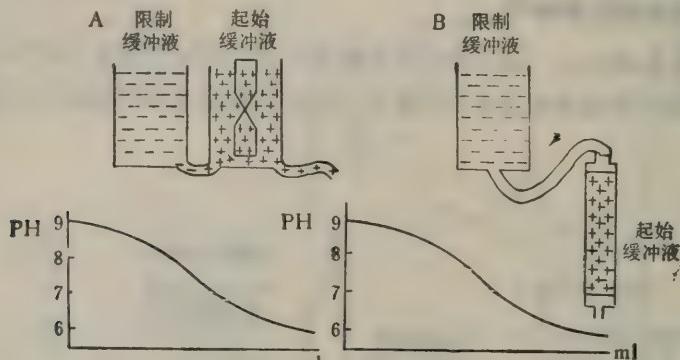


图 5-29 梯度形成图解
A: 离子交换色谱; B: 色谱聚焦

色谱聚焦是利用离子交换剂本身的带电基团的缓冲作用, 当洗脱缓冲液滴到离子交换剂上, 自动形成 pH 梯度。

例如要形成 pH 9—6 的下降梯度, 色谱柱内的 pH 比洗脱液高。可选择一个具有碱性缓冲基团的阴离子交换剂, 如商品名为 PBE 94 的阴离子交换剂装填在柱上, 首先平衡到 pH 9, 洗脱液的 pH (相应为限制缓冲液) 选定为 pH 6, 其中含商品名为多缓冲剂 (polybuffer) 的物质 (如 polybuffer 96)。当洗脱液从顶部滴入 PBE 94 色谱柱, 大部份酸性成份与阴离子交换剂的碱性基团结合, 最初从柱上流出的溶液的 pH 接近于起始缓冲液 (图 5-30), 洗脱过程中在柱上每一点的 pH 随着更多的缓冲剂加入而逐渐下降, 最后几乎整个色谱柱被洗脱液所平衡, 最后流出液的 pH 等于洗脱液的 pH (即 pH 6)。

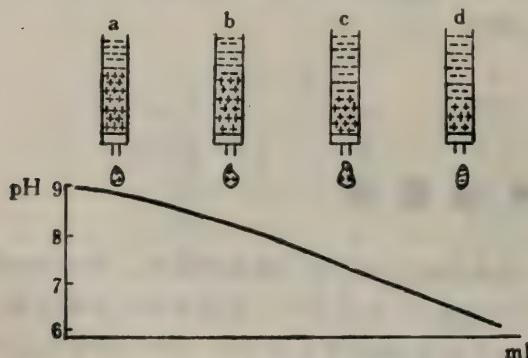


图 5-30 PBE 94 柱用多缓冲剂洗脱时
pH 梯度 (pH9—6) 的形成
a, b, c, d 代表不同的洗脱阶段

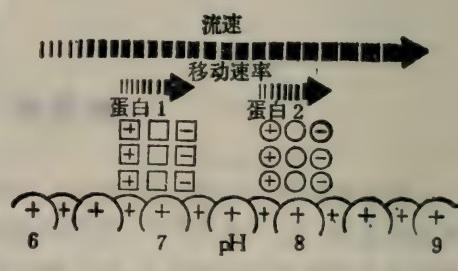


图 5-31 蛋白质分子在色谱聚焦时的行为
假定蛋白质 1 等电点为 7, 蛋白质 2 等
电点为 8

(二) 蛋白质的行为

蛋白质所带的电荷取决于它们的等电点和介质的 pH，当介质的 pH 低于它的等电点时，蛋白质带正电荷，它不与阴离子交换剂结合，随洗脱液向下移动，然而，在蛋白质从柱顶向下移的过程中，其周围的 pH 逐步增高(图 5-31)。当它移动到某一点，其环境的 pH 高于蛋白质等电点时，蛋白质由带正电荷变为带负电荷，而与离子交换剂结合。随着洗脱过程的进行，所形成的 pH 梯度也不断下降，当 pH 下降至蛋白质的等电点时，蛋白质又重新脱离交换剂而下移，移至 pH 大于其等电点时又重新结合，这样不断重复，直至蛋白质从柱下流出。不同的蛋白质有不同的等电点，在它们被离子交换剂结合以前将移动不同的距离，按等电点顺序流出(图 5-31)。

(三) 聚焦效应

当一种蛋白质在柱上随洗脱液下移至等电点处，此时其移动速度明显减慢。如果此时加上相同的第二个样品，它将以洗脱液移动的速度下移，直至追上正在慢移的第一个样品处(聚焦)。然后这两个样品一起下移，从柱下一起洗脱出来。但是所有样品必须在第一个样品峰尚未被洗脱之前加入，否则就不能聚焦。如果加入的第二个样品的等电点比第一个样品高，它可以越过第一个样品区而先被洗出(图 5-32)。

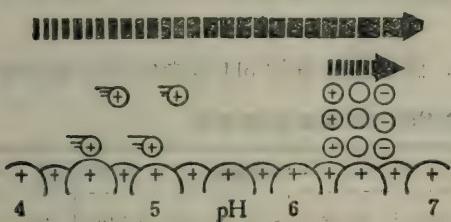


图 5-32 色谱聚焦的聚焦效应

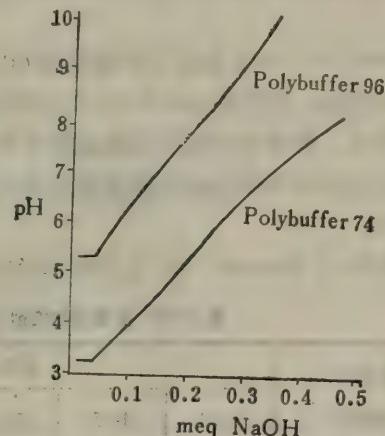


图 5-33 2 毫升多缓冲剂用 0.1 N NaOH 滴定曲线

二、多缓冲剂

多缓冲剂是一种两性电解质性缓冲剂，性质与两性载体电解质相似，是分子量大小不同的多种组分的多羧基多氨基化合物，瑞典的 Pharmacia 公司专门设计生产的 Polybuffer 96 和 Polybuffer 74，它们分别适用于 pH 9—6 和 pH 7—4 范围的色谱聚焦。这二种多缓冲剂相匹配的多缓冲交换剂是 PBE 94。对于 pH 9 以上的色谱聚焦则选用 pH8—10.5 的两性载体电解质 (Pharmalyte) 配以相应的 PBE 118。

在所使用的 pH 范围内，多缓冲剂 96 和 74 有很均衡的缓冲容量，当色谱聚焦时，能提供一个平滑的线性 pH 梯度，它们的滴定曲线见图 5-33。

多缓冲剂在 280 nm 的吸收很低，但在 250 nm 有较大的吸收，故洗脱液的监测应在 280nm(图 5-34)。

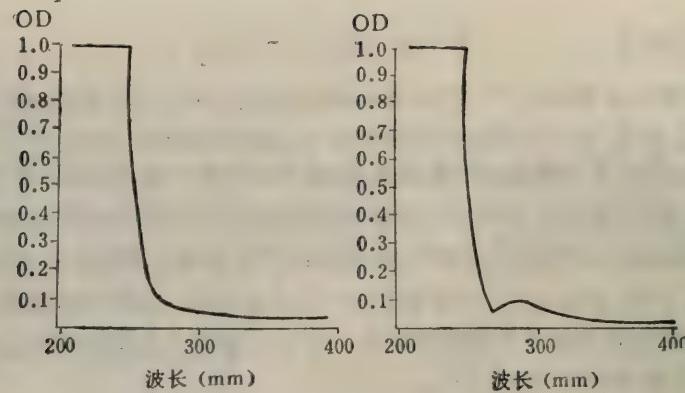


图 5-34 多缓冲剂的紫外吸收光谱

多缓冲剂通常以无菌的液体形式提供 (0.075 毫摩尔 pH 单位/毫升), 用前稀释。于 3—8°C 暗处贮存。

三、多缓冲交换剂

PBE 118 和 94 是以交联琼脂糖 6B (Sepharose 6B) 为载体, 并在糖上通过醚键偶合上配基而成的。它们在 pH 3—12 的范围内对水、盐、有机溶剂都是稳定的。它们也能在 8M 脲中使用。多缓冲剂的交联性质使它有很好的物理稳定性和流速, 并防止了由于不同 pH 值静电相互作用所引起的床体积的变化, 它的盐型在 pH 7 能耐受 110—120°C 的高压灭菌处理。

偶联剂 Sepharose 6B 上的配基经特别选择, 确保在很宽的 pH 范围内有均衡的缓冲

表 5-16 多缓冲交换剂 PBE 96 和 PBE 118 的缓冲容量资料

多缓冲 交换剂	总容量 meq/100 毫升不同 pH 间隔凝胶							
	3—4	4—5	5—6	6—7	7—8	8—9	9—10	10—11
PBE 94	2.2	3.3	3.1	3.0	3.5	3.9	3.1	2.1
PBE 118	0.6	0.3	0.9	1.7	2.8	3.7	4.6	4.9

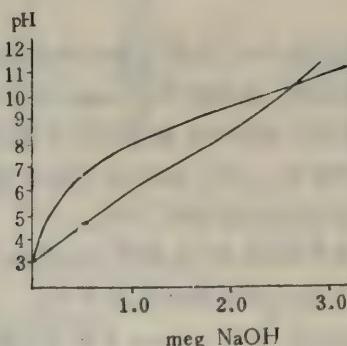
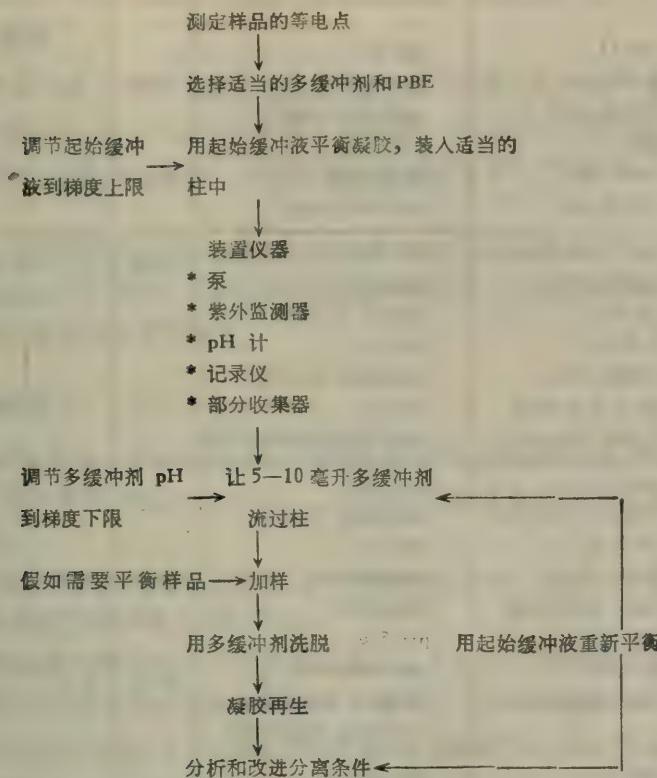


图 5-35 10 毫升 PBE 118 和 PBE 94 在 1M KCl 中的滴定曲线

容量。这两种多缓冲交换剂的缓冲容量数据见表 5-16，它们的滴定曲线见图 5-35。它们的商品是以悬浮液形式提供(含 24% 乙醇)。

四、操作步骤^[46,47]



(一) 凝胶和缓冲剂的选择

每次使用的多缓冲剂和多缓冲交换剂的 pH 间隔为三个单位。为了提高分辨率，选择的实验 pH 范围应包含要分离样品的等电点，并使其有 2/3—1/2 的柱长的吸附解吸时间。不同 pH 范围色谱聚焦缓冲剂和凝胶的选择见表 5-17。

(二) 凝胶柱的准备

色谱聚焦需要的凝胶量取决于样品的量、样品的性质、杂质的情况以及实验分辨率要求。大多数情况下，20—30 毫升床体积已足够分离 1—200 毫克蛋白质/pH 单位。

装柱之前，凝胶必须用起始缓冲液平衡，每种 pH 相应的起始缓冲液见表 5-17。交换剂的反离子是 Cl^- ，除 Cl^- 以外的单价阴离子也可作为反离子，但这些阴离子的 pK_a 必须比梯度选择的最低点至少低二个 pH 单位。碳酸氢盐离子 (HCO_3^-) 会引起 pH 梯度的变化，所以所有的缓冲液使用前必须除气。大气中的 CO_2 在 pH 5.5—6.5 条件下会使梯度变平坦，用醋酸根作反离子可防止这一情况，但对多缓冲剂 74 则不能用醋酸根作为反离子。

柱装填的好坏直接影响分辨率，如果操作得当，可达 0.02 pH 带宽的分离效果。通常装柱过程如下：

表 5-17 不同 pH 范围色谱聚焦所用凝胶和缓冲剂

凝胶的 pH 范围	起始缓冲液	洗脱液	稀释倍数	所用溶液近似体积 (以柱体积为 1 计算)		
				梯度开始前	梯度体积	总体积
10.5—9 ¹ PBE 118	pH 11 0.025 M 三乙胺-HCl pH 11 0.025 M 三乙胺-HCl	— pH 8.0 pharmalyte pH 8-10.5 · HCl pH 7 pharmalyte pH 8-10.5 HCl	— 1:45 1:45	— 1.5 2.0	— 11.5 11.5	— 13.0 13.5
10.5—8 PBE 118						
10.5—7 PBE 118						
9—8 ² PBE 94	pH 9.4 0.025M 乙醇胺-HCl	pH 8.0 pharmalyte	1:45	1.5	10.5	12.0
9—7 PBE 94	pH 9.4 0.025 M 乙醇胺-HCl	pH 8-10.5 · HCl pH 7.0 polybuffer 96-HCl	1:10	2.0	12.0	14.0
9—6 PBE 94	pH 9.4 0.025M 乙醇胺 CH ₃ COOH	pH 6.0 polybafffer 96-CH ₃ COOH	1:10	1.5	10.5	12.0
8—7 PBE 94	pH 8.3 0.025M Tris·HCl	pH 7.0 polybuffer 96-HCl	1:13	1.5	9.0	10.5
8—6 PBE 94	pH 8.3 0.025 M Tris·CH ₃ COOH	pH 6.0 polybuffer 96 CH ₃ COOH	1:13	3.0	9.0	12.0
8—5 ³ PBE 94	pH 8.3 0.025M Tris·CH ₃ COOH	pH 5.0 polybuffer 96 (30%) + polybuffer 74 (70%)—CH ₃ COOH	1:10	2.0	8.5	10.5
7—6 PBE 94	pH 7.4 0.025 M 吡唑 CH ₃ COOH	pH 6.0 polybuffer 96- CH ₃ COOH	1:13	3.0	7.0	10.0
7—5 PBE 94	pH 7.4 0.025 M 吡唑-HCl	pH 5.0 polybuffer 74·HCl	1:8	2.5	11.5	14.0
7—4 PBE 94	pH 7.4 0.025M 吡唑-HCl	pH 4.0 polybuffer 74·HCl	1:8	2.5	11.5	14.0
6—5 PBE 94	pH 6.2 0.025 M 组氨酸-HCl	pH 5.0 polybuffer 74·HCl	1:10	2.0	8.0	10.0
6—4 PBE 94	pH 6.2 0.025M 组氨酸-HCl	pH 4.0 polybuffer 74·HCl	1:8	2.0	7.0	9.0
5—4 PBE 94	pH 5.5 0.025 M 呱嗪·HCl	pH 4.0 polybuffer 74·HCl	1:10	3.0	9.0	12.0

- (1) 凝胶按 1:1 (V/V) 悬浮于起始缓冲液中,除去气泡。
- (2) 将柱调垂直并除尽底部尼龙网下的气泡,关闭柱下端出口。
- (3) 在柱中放 2—3 毫升起始缓冲液,在搅拌下将凝胶倒入柱中。
- (4) 打开柱底部开关,待凝胶沉降后仔细将柱顶部接头装好,排除所有气泡。

(5) 用 10—15 个床体积起始缓冲液平衡至流出液的 pH 和电导系数与起始缓冲液相同。

色谱柱的装填好坏可用有色的牛细胞色素 c 检查，因其等电点为 10.5，不被柱吸附，很快穿过柱流出。

(三) 样品的准备

上样量取决于每个区带中蛋白质的量，通常每 10 毫升床体积可加 100 毫克蛋白质样品，由于有聚焦效应，因此样品的体积是不重要的，只要在欲分离的物质从柱上流下之前加入样品，对分离结果均无影响，样品体积最好不超过 0.5 个床体积，样品不能含过量盐 ($L < 0.05$)。

上样前样品要对洗脱液或起始缓冲液透析平衡，如果样品体积小于 10 毫升，最好先通过一个 Sephadex G-25 柱，用起始或洗脱缓冲液洗脱，以达到最好的平衡效果。如果缓冲液浓度很低，样品 pH 也不重要。

(四) 上样和洗脱

上样最好是通过一个加样器，为了确保样品均匀平整地加到床面上，可在床顶部小心铺一层 1—2 厘米厚的 Sephadex G-25。上样前应先加 5 毫升洗脱液以避免样品处于极端(过碱)的 pH。

上样后，首先用洗脱缓冲液淋洗，pH 梯度自动形成。梯度的 pH 上限由起始缓冲液确定，其下限由淋洗缓冲液的 pH 决定。

推荐使用的缓冲液组成及所用洗脱液体积见表 5-17。pH 梯度的斜率(或梯度体积)是由用于洗脱的多缓冲剂的浓度决定的。浓度高，所需的梯度体积小，pH 梯度斜率陡，洗脱峰窄，但分辨率下降，反之，pH 梯度斜率小，洗脱峰宽，但分辨率高。采用通常推荐的多缓冲剂浓度，总洗脱体积需 12—13 个床体积，洗脱时的流速一般选择 $30—40 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

(五) 从分离的蛋白质中除去多缓冲剂的方法

1. 沉淀法 加入固体硫酸铵到 80—100% 饱和度，放置 1—2 小时，使蛋白质沉淀。因为处在等电点 pH 的蛋白质很容易沉淀。离心收集沉淀，用饱和硫酸铵洗两次，然后透析除硫酸铵。

2. 凝胶过滤 用 Sephadex G-75 可以将分子量大于 25,000 的蛋白质和多缓冲剂分开。

3. 亲和色谱法 应用一个亲和色谱柱，分离的蛋白质通过柱为柱中的吸附剂所吸附，而多缓冲剂没阻留地流出柱外，再将蛋白质洗下。

4. 疏水相互作用色谱法 利用载体与蛋白质样品的疏水基团间的相互作用。在水相中提高中性盐的浓度或降低乙二醇的浓度增强体系的疏水性可增强疏水基团的相互作用。

疏水色谱柱中装填苯基或酚基-琼脂糖 CL-4B，用 80% 饱和度硫酸铵平衡，对 10 毫克蛋白质需 1 毫升凝胶，用 2—3 个床体积的 80% 硫酸铵洗凝胶。蛋白质样品通过柱产生疏水作用的结合，然后用低离子强度的缓冲液洗脱。

(六) 多缓冲离子交换剂的再生

多缓冲离子交换剂的再生可以在柱上进行。凝胶用 2—3 个床体积的 1 M NaCl 洗，以除去结合的物质。用 0.1 M HCl 洗则可除去结合牢固的蛋白质。假如使用 HCl，一当洗完凝胶就要尽快平衡到较高的 pH。

五、应用实例^[46]

1. 蛋白质的一个模式混合物的分离 结果见图 5-36。

从图中显示了高分辨率和窄的分离峰。

分离条件如下：在 pH 7—4 范围内，柱 C 10/20 床高 15 厘米，样品 4 毫升洗脱缓冲液含有马肌红蛋白（12 毫克），碳酸酐酶（8 毫克）和白蛋白（12 毫克），洗脱条件：起始缓冲液 0.025 M 咪唑 HCl，pH 7.4，洗脱缓冲液 0.075 mM/pH 单位/毫升多缓冲剂 74，pH 4，流速 12.5 厘米/小时。

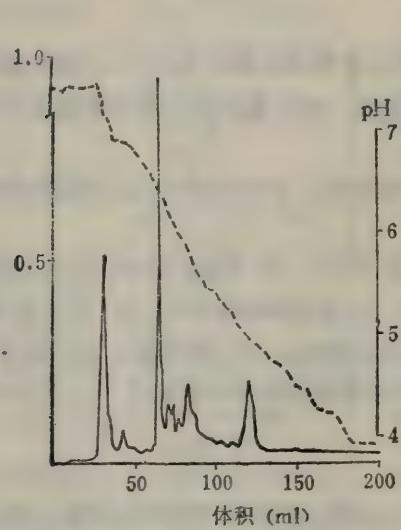


图 5-36 蛋白质的一个模式混合物的分离

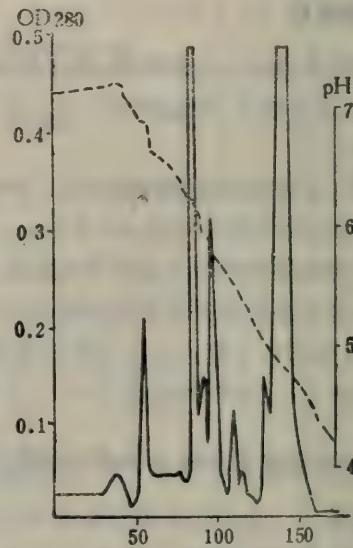


图 5-37 卵白的分级分离

2. 粗卵蛋白的分级分离 图 5-37 为粗卵蛋白在 pH 7—4 梯度上的分级分离。卵白过滤，用多缓冲剂 74 稀释，然后 3000g 离心 10 分钟，上 PBE 94 柱，以 0.025 M 咪唑 HCl (pH 7.2) 平衡，用 1:10 多缓冲剂 74 (pH 4) 洗脱，分辨率良好。

分离条件如下：柱 SR 10/50，床高 30 厘米，样品 5 毫升，洗脱缓冲液含 0.5 毫升卵白。洗脱条件：起始缓冲液 0.025 M 咪唑-HCl，pH 7.5，流速 40 厘米/小时。

3. 麋鹿肌肉提取水溶性蛋白的分离 图 5-38 表明在高 pH 下也有良好的分辨率。10 克麋鹿肌肉用等体积水匀浆，3000g 离心 10 分钟，上清液用洗脱液平衡，上 PBE 94 柱，以多缓冲剂 96 洗脱。

分离条件如下：柱 C 10/40，床高 45 厘米，样品：5 毫升麋鹿肌肉匀浆上清液；洗脱条件：起始缓冲液，0.025 M 乙酸铵-HCl，pH 9.4，洗脱缓冲液，0.0075 mM/pH 单位/

毫升, 多缓冲剂 96, pH6 流速 20 厘米/小时。

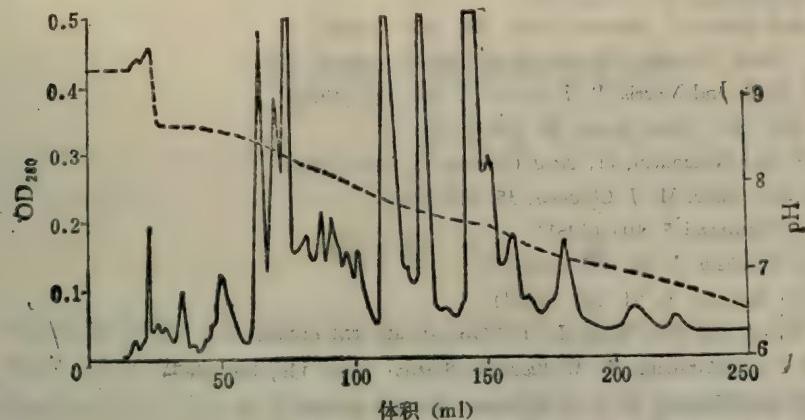


图 5-38 从鹿肌肉提取的水溶性蛋白质的分离

4. Trichoderma reesei 细胞的蛋白质的分离 图 5-39 表明色谱聚丙烯酰胺高容量分离的优点。Trichoderma reesei 是产生大量胞外纤维素酶的微生物, 这些酶可用在 PBE 94 上色谱聚丙烯酰胺制备分离。

分离条件如下: 柱 SR 10/50, 床高 30 厘米, 样品: 5 毫升, 洗脱缓冲液含 460 毫克冷冻干燥的培养上清液。洗脱条件: 起始缓冲液 0.025 M 吡啶-HCl, pH 7.4, 洗脱缓冲液 0.0075 mM/pH 单位/毫升, 多缓冲剂 74, pH4, 流速 30 厘米/小时。

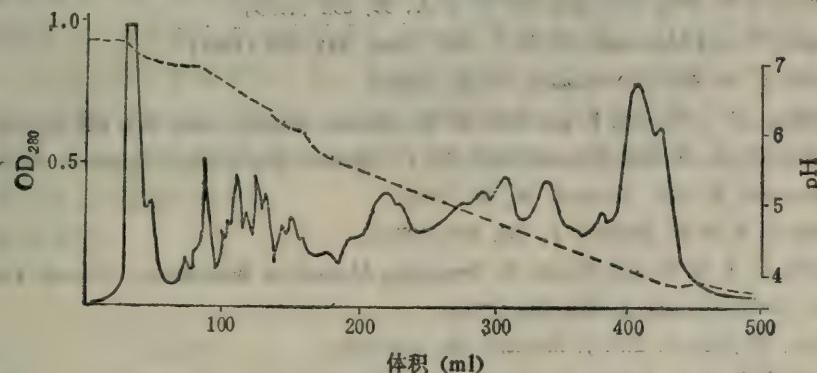


图 5-39 Trichoderma reesei 胞外蛋白质的分离

参 考 文 献

- [1] Himmelhoch, S. R., "Methods in Enzymology," Vol XXII, p. 273--286 (1971)
- [2] Mikes, O. et al., Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods p. 218 (1979)
- [3] 张树政、仲如: 微生物通报, 2, 30(1974)
- [4] Morris, C. J. O. R. and Morris, P., "Separation Methods in Biochemistry", Pitman Publishing, Second edition, Canada, p. 293 (1976)
- [5] 林卓坤主编, 色谱法(一)科学出版社 p. 42(1982).
- [6] Sober, N. A. and Peterson, E. A., Fedn. Proc., 17, 116 (1958)
- [7] Rhodes, M. B. et al., *J. Biol. Chem.*, 230, 399(1958) 234, 2054 (1959)
- [8] Hardy, S. J. S., et al., *Biochemistry*, 8, 2897 (1969).

- [9] Peterson, E. A., and Kuff, E. L., *Biochemistry*, **8**, 2916 (1969)
- [10] 蔡景霞等: 动物学研究, **1**(3), 320(1980)
- [11] Porath, J. and Flodin, P., *Nature, Lond.*, **183**, 1657 (1959)
- [12] Hjerten, S., *Archs Biochem. Biophys. Suppl.*, **1**, 147 (1962)
- [13] Morris, C. J. O. R. and Morris, P., *Biochem. J.*, **124**, 517 (1971)
- [14] Araki, C., *Bull. Soc. Chem. Japan*, **29**, 543 (1956)
- [15] Raymond, S. and Nakamichi, N., *Anal Chromat.* **6**, 119 (1968)
- [16] Kawata, H. and Chase, M., *J. Chromat.* **35**, 565(1968)
- [17] Flodin, P., *J. Chromat.* **5**, 103 (1961)
- [18] Andraws, R., *Biochem. J.*, **96**, 595 (1965)
- [19] Andraws, R., *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964)
- [20] John, M., Trenel, and Dell Weg, H., *J. Chromat.* **42**, 476 (1969)
- [21] Laurent, T. C. and Granath, K. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **136**, 196(1967)
- [22] Hayes, F. N. and Mitchell, V. E., *J. Chromat.* **39**, 139 (1969)
- [23] Reynier, M., Aubert M. and Monier, R. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 1205 (1967)
- [24] Oberg, B. and Philipson, L., *Archs. Biochem. Biophys.*, **119**, 504 (1967)
- [25] Hjerten, S., *Protides Biol. Fluids.*, **14**, 553 (1966)
- [26] Mauritzzen, C. M., Starbuck, W. C., Saroja, I. S., Taylor, C. W. and Busch, H. J., *Biol. Chem.*, **242**, 2240 (1967)
- [27] Porath, J. and Bennich, H., *Archs. Biochem. Biophys., Suppl.* **1**, 152 (1962)
- [28] Affinity Chromatography Principles and Methods, Pharmacia Fine Chemicals AB, uppsalal, Sweden (1979).
- [29] 袁中一等, 固相酶与亲和层析。科学出版社 (1975)
- [30] Lerman, L. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **39**, 232 (1953)
- [31] Arsenis, C. and McCormick, D. B., *J. Biol. Chem.* **241**, 330 (1966)
- [32] Knight, C. S., *Adv. in Chromatogr.* **4**, 61 (1967)
- [33] Robinson, P. J., Durnill, P. and Lilly, M. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 659 (1971)
- [34] Weibel, M. K., Weetall, H. and Bright, H. J., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 347 (1971)
- [35] Cuatrecasas, P., *Adv. Enzymol.* **36**, 29 (1972)
- [36] Lowe, C. R. et al., *Biochem. J.*, **133**, 499 (1973)
- [37] Morris, C. J. O. R. and Morris, P., Separation Methods in Biochemistry, Pitman Publishing, Second edition, Canada, p 231, 233 (1976)
- [38] Comer, M. J. et al., *Eur. J. Biochem.*, **55**, 201(1975)
- [39] Lowe, C. R. et al., Affinity Chromatography (1974)
- [40] Jones, D. S., Jay, F., Lundgren, H., *Nucleic Acids Res.*, **3**, 1569 (1976)
- [41] William, B., Jakoby and Meir Wilchek, Methods in Enzymology, Vol. XXXIV, Academic Press, New York, p. 267—271 (1974)
- [42] Weintraub, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 83 (1970)
- [43] Sluyterman, L. A. E., Elgersma, O., *J. Chromatogr.*, **150**, 17—30 (1978)
- [44] Sluyterman, L. A. E., Wijdenes, J., *J. Chromatogr.*, **150**, 31—44 (1978)
- [45] Sluyterman, L. A. E., *Trends Biochem. Sci* **7**: 5, 168 (1982)
- [46] Chromatofocusing with polybuffer TM and PBE TM, Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden (1980)
- [47] 雷克健: 生物化学与生物物理进展, **3**, 44(1982)

第六章 制备离心技术

劳子谦

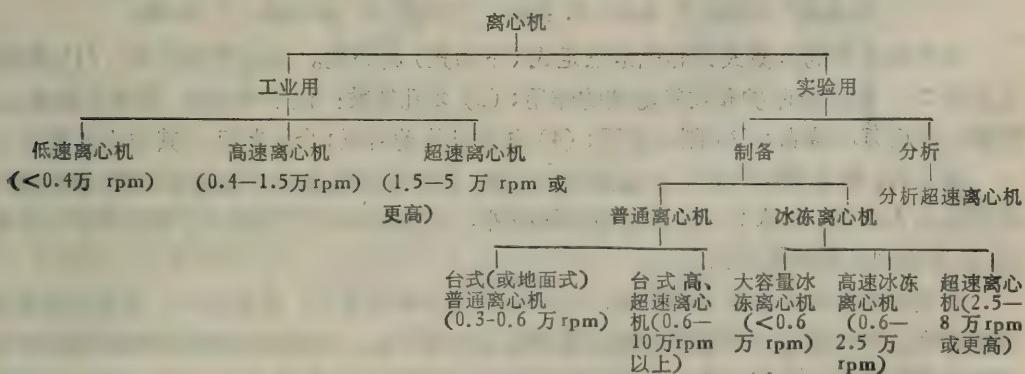
第一节 引言

离心机是借离心力分离液相非均一体系的设备。离心的形式有：(1) 离心过滤，(2) 离心沉降（或澄清），(3) 离心分离。其目的是达到固—液或液—液的分离。离心是利用旋转运动的离心力，以及物质的沉降系数或浮力密度的差别进行分离、浓缩和提纯的一项操作。

在有孔转鼓的离心机中通过过滤介质分离悬浮液的过程为离心过滤；利用固液两相比重的差异在离心机无孔转鼓或管子中进行悬浮液沉降分离者为离心沉降（如用于净制含少量固体的液体时也称离心澄清）；利用不同溶质颗粒在液体各部分分布的差异，分离不同比重液体的过程为离心分离。离心过滤、离心沉降同属固—液分离，离心分离则属液—液分离。

离心机可以按以下几个方面进行分类：(1) 转速：低、高、超速；(2) 用途：工业或实用，分析或制备；(3) 离心形式：过滤、沉降或分离；(4) 操作方式：连续、半连续、间歇；(5) 结构特点：如依转动部分的形状可分转鼓（有孔或无孔）、长管式的转筒、角式和外摆式转子、分析型转子和区带转子等。依驱动方式有手摇式、油涡轮式、气动式、磁悬式和电动式等。依旋转轴位置有直立式、水平式、倾斜式等；(6) 卸料法：人工、重力、离心力、刮刀、螺旋、活塞、震动、喷嘴、蠕动泵等；(7) 使用温度：冷冻和无冷冻；(8) 工作性质：通用型或专用型，小型或大型等。

一般分类如下：



由于离心机的结构、性能和用途等差别很大，分类法也各不相同，特别在转速范围上，有关文献、教科书记载的出入较大。同时，随着离心技术的发展，离心机现已趋向于多效能。如制备超速离心机也配备分析型转子和光学检测系统，可作某些分析研究工作；而分

析型离心机有些也附有制备用转子。又如某些附有大容量区带转子或连续流动式转子的超速离心机，能用于工业生产，也远远超越了实验室的应用范围。

第二节 一般制备离心^[1-3]

一般制备离心是指在分离、浓缩、提纯样品中，不必制备密度梯度的一次完成的离心操作。使用的机种包括所有工业离心机和实验室用低、高速离心机。下面介绍几类离心机的简单结构、原理和使用。

一、过滤式离心机

这种离心机转速一般为 450—3,500 rpm，按操作方式和卸料方式可分为：间歇式（人工或刮刀自动卸料）；连续式（自动、震动、活塞或螺旋卸料）。

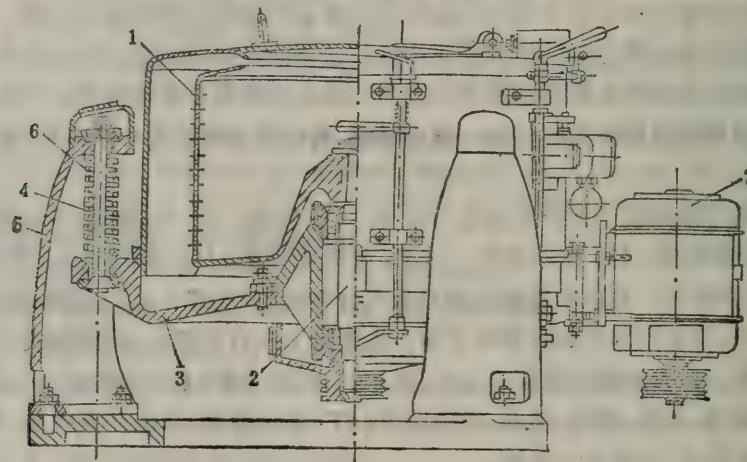


图 6-1 三足式离心机的结构

1. 转鼓，2. 主轴，3. 机座，4. 拉杆，5. 支柱，6. 缓冲弹簧，7. 电动机

目前最常用的过滤式离心机是三足式（下动式）离心机。其主要部件有：(1) 外壳：上方开口。有安全保护和收集滤液的作用；(2) 多孔转鼓：位于外壳内，固定在转轴上，转鼓内表面复以滤布；(3) 制动装置；(4) 电动机传动装置；(5) 支架。其结构如图 6-1。

离心时，转鼓滤布内装入待过滤的悬浮液，当转速逐渐加快而高速运转时，鼓内悬浮液受离心力作用，液体穿过滤布被甩出转鼓外。滤液经外壳下部排出，固体则留在布袋内，从而达到固液分离目的。

这类采用间歇式人工卸料的离心机结构及操作均较简单，性能良好。其缺点是取出滤饼费力、耗时，而且由于驱动和制动装置设在转鼓下面，容易引起液体渗漏腐蚀及带来维修保养的不便。为了克服以上缺点，人们设计了上悬式离心机，这种离心机的传动系统安装在转鼓上方，具有稳定、卸料较快、固体颗粒破碎少和不受液体腐蚀的优点。

在生化、微生物工业中，过滤式离心机已用于味精、柠檬酸、抗菌素及某些生化药物和酶制剂等结晶或较大固体颗粒的过滤，脱水效率很高。

二、沉降式离心机

这类离心机品种较多，根据其结构又可分为管式、钵式、碟片式和倾析式。它们的卸料方式也很多，如人工、离心力、刮刀、螺旋、喷嘴、自动卸料等。

1. 台式或地面式普通离心机 这是一类结构最简单的实验室常用的低、中速离心机，转速在 3,000—6,000 rpm。其转子一般用角式或外摆式，多用交流整流子电动机驱动，但电动机的碳刷易磨损而导致离心机损坏；转速是用电压调节器调节，起动电流大，速度升降不够均匀。操作一般在室温下进行，但个别机种也配有冷却装置，如贝克曼公司的 TJ-6R 台式离心机的可调温度为 0—20°C。

2. 高速冰冻离心机 这类实验室常用的离心机最高转速可达 18,000—25,000 rpm，因此需有冷却离心腔的致冷设备，并用热电偶监测腔内的温度，一般温度控制在 0—4°C。其转动部分是各种角式或外摆式转子，有的还配备区带转子、连续流动式转子或其它转子。速度控制比台式离心机精密准确。操作方式除间歇式外也有连续式。其应用见表 6-1。

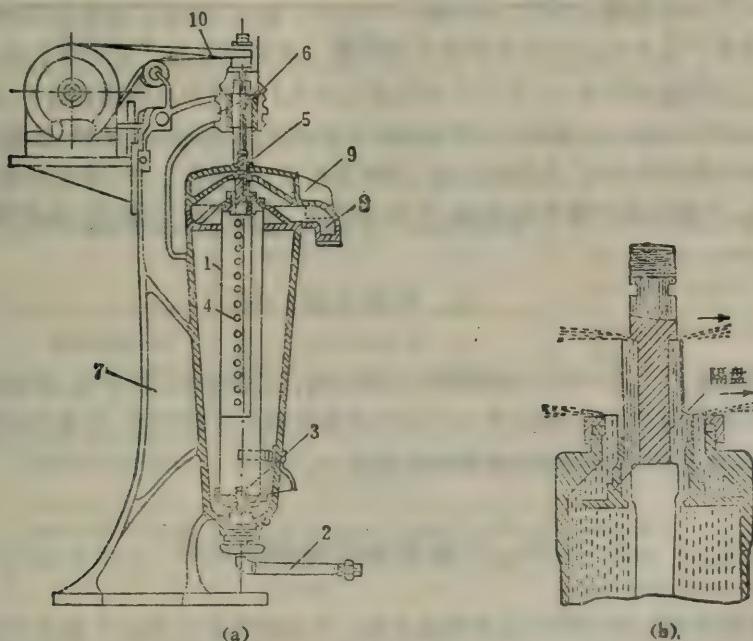


图 6-2 管式超速离心机结构图

1. 转鼓，2. 悬浮液加入管，3. 折转板，4. 十字形挡板，5. 转鼓头，6. 挠性轴，7. 机座，
8. 重液排出管，9. 轻液排出管，10. 传动装置

3. 管式高速或超速离心机 这是一类工业用离心机，转速约在 8,000—45,000 rpm，用于固—液分离时为间歇式操作，也可用于液—液连续分离。主要由五部分组成：(1)转筒；(2)主轴；(3)电动机及传动装置；(4)制动器；(5)外壳和机座。管式超速离心机的结构如图 6-2。

离心沉降时，先把转筒上部的重液出口堵塞，后将悬浮液在静止、慢速或全速下从转

筒底部加液管送入。悬浮液向转筒上部移动时，颗粒受离心力作用而沉降到转筒内壁上，

形成沉渣层，留在内层的清液或轻液（含细颗粒）则从上方轻液出口流出。离心完后取出转筒，人工清除滤渣。如用于液一液离心分离时，液体即按不同比重从转筒上部的轻、重液出口分别排出，工作原理与离心沉降相同。

管式离心机结构简单、紧凑、转速高、密封性好，有良好的沉降效果，主要用来从培养液（5—500升）中回收菌体及用于化工、食品等部门。其缺点是卸料麻烦，容量有限。

4. 碟片式离心机 碟片式离心机是在管式离心机的基础上发展起来的，转速为4,500—7,500 rpm。根据卸料方法的不同可分为喷嘴型碟片式离心机和自动间歇卸料型碟片式离心机。其主要工作部分是转鼓，在

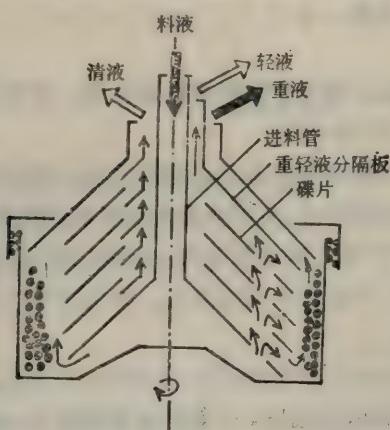


图 6-3 碟片式离心机的工作原理

左侧：液一固分离；
右侧：液一液或液一液一固分离

转鼓中加入了许多重迭的碟片，每个碟片间距约1毫米，缩短了颗粒的沉降距离，大大提高了分离效果。这种离心机可用于固一液和液一液两相分离，也可用于液一液一固三相分离。其工作原理如图6-3。两相分离的碟片无孔；三相分离的碟片有孔，液体由各碟片孔道最后移动到转鼓上方出口，并根据两部分液体比重不同各自从轻、重液出口排出。

这种离心机结构简单、沉降距离短、沉降面积大，能连续生产、分离效率高，已广泛用于发酵工业，作菌体的收集及抗菌素、疫苗的分离，也用于化工、医药、食品等部门。

三、分离式离心机

主要指上述用于液一液分离的碟片式离心机，以及分离式管型高、超速离心机。离心时各组分在离心力作用下，按比重大小的不同将液相分成若干层，比重大的在外层，比重小的在内层，分别从转鼓（管）的不同出口排出。

四、一般制备离心机的选择

通常是根据离心物料的性质选择离心机。凡固相颗粒比重小于或等于液相、颗粒直径在0.01—1毫米（或以上）的物料可选用过滤式离心机。固相颗粒的比重大于液相（相差3%左右）颗粒直径小于10微米以及具有压缩性（纤维状或胶状）的物料则应选用沉降式离心机。如颗粒直径为10微米左右宜用普通沉降离心机，用过滤式则滤饼薄、损失大。直径小于1微米的颗粒须用管式高、超速或钵式高速，以及碟片式离心机，但管式离心机仅在悬浮液颗粒浓度小于1%才适用，浓度太大要用连续式离心机，以免卸料、拆装频繁而损坏机件。0.01—0.1毫米（或以上）的颗粒可用沉降式或过滤式，如固体浓度高达1—50%，固液相比重差较大的悬浮液，最好用倾析式螺旋卸料的沉降离心机。压力较高（10个大气压以下）或有毒、易燃、易爆物料须用倾析式螺旋卸料和碟片式等密闭型离心机，或

用管式高、超速离心机。固液分离时，有时还要结合考虑离心液的澄清度或固体物的含水量，过滤式比沉降式的沉渣湿度大。分离式离心机只适用于乳浊液分离或含固体很少的悬浮液的浓缩。

第三节 制备超离心

制备超离心技术就是在强大的离心力场下，依据物质的沉降系数、质量和形状不同，将混合物样品中各组分分离，提纯的一项技术。在生物化学、分子生物学以及细胞生物学的发展中，制备超离心技术起着很重要的作用。迄今，这项技术已广泛用于各种细胞器、病毒以及生物大分子的分离，成了生物学、医学和化学等领域中现代实验室不可缺少的制备和分析手段。

制备超离心不同于分析超离心，它的主要目的是最大限度地从样品中分离高纯度的所需组分。在离心技术的发展史上，制备超离心是制备离心发展的最高形式，它与其它低级离心形式的不同之处如表 6-1。

表 6-1 三种不同级别的制备离心机的比较

类 型	普通离心机	高速离心机	超速离心机
最大转速 (rpm)	6,000	25,000	75,000 以上
最大相对离心力 (g)	6,000	89,000	510,000 以上
容量	几十毫升到几升	一般 1.5 升左右 (有大容量连续流动式)	几十到几百毫升，最大达到 1.7 升以上(如用连续流动式则一次分离可达几升至几十升)
分离形式	固液沉降分离	固液沉降分离	密度梯度区带分离或差速沉降分离。
离心管平衡允许误差	0.25 克		0.1 克
转子	角式和外摆式转子	角式、外摆式转子(有些还配备区带转子或其它转子)	角式、外摆式和区带转子(有些还配备分析和连续式转子)
仪器结构性能和特点	速度不能严格控制，多数室温下操作。	有消除空气和转子间摩擦热的致冷装置，速度和温度控制较准确、严格。	备有消除转子与空气摩擦热的真空和冷却系统，有更为精确的速度和温度控制、监测系统，有保证转子正常运转的传动和制动装置等。
应用	收集易沉降的大颗粒(如红血球、酵母细胞等)。	收集微生物、细胞碎片、大细胞器、硫酸铵沉淀物和免疫沉淀物等。但不能有效沉淀病毒、小细胞器(如核糖体)、蛋白质等大分子。	主要分离细胞器、病毒、核酸、蛋白质、多糖等，甚至能分开分子大小相近的同位素标记物 ^{15}N -DNA 和未标记的 DNA。

由于许多具有生物活性的生物大分子和细胞器很不稳定，在分离时要求温度低，操作条件缓和，不能应用一般的化学分离法。制备超离心机具有冷却和真空系统，分离制备上有明显的优越性。

一、原理和计算^[4,6,7,10]

制备超离心机的设计原理是：利用转子高速旋转时所产生的强大离心力，加快颗粒的沉降速度，把样品中不同沉降系数或浮力密度差的物质分离开。制备超离心实验的关键是如何根据颗粒和介质的性质以及转子的某些参数来确定转速和离心时间。颗粒（细胞、细胞器及大分子的统称）在离心力场下的沉降情况都与沉降速度和沉降时间有关，沉降的时间和速度取决于：（1）离心力；（2）颗粒的大小、形状和密度；（3）沉降介质的密度和粘度。

1. 离心力 制备离心是根据物质在离心力场发生的变化来分离物质的。当离心机转子以一定的角速度 ω （弧度/秒）旋转，颗粒的旋转半径为 r （厘米）时，任何颗粒均经受一个向外的离心力，此离心力为：

$$F = \omega^2 r \quad (1)$$

F 通常以地心引力表示，称为相对离心力（RCF）。相对离心力是指在离心力场，作用于颗粒的离心力相当于地球重力的倍数，单位是重力加速度 g （980 厘米/秒²）。这时 RCF 可用方程式规定如下：

$$RCF = \frac{\omega^2 r}{980} \quad (2)$$

实用上，这一关系式常用每分钟转数 n （或 rpm），以更通用的表达方式来表示。由于 $\omega = \frac{2\pi n}{60}$ ，于是：

$$RCF = \frac{4\pi^2 n^2 r}{3600 \times 980}$$

简化得：

$$RCF = 1.119 \times 10^{-5} n^2 r \quad (3)$$

一般情况下，低速离心时常以 rpm 来表示，高速离心则以 g 表示。计算颗粒的相对离心力时，应注意离心管与旋转轴中心的距离 r 。沉降颗粒在离心管中所处位置不同，所受离心力也不同。

因此，报告超离心条件时，通常总是用地心引力的倍数（ $\times g$ ）代替每分钟转数（rpm），因为它可以真实反映颗粒在离心管不同位置的离心力及其动态变化。科技文献中，离心力的数据常指其平均值（RCF_{平均}），即离心管中点的离心力。

为了便于进行转速和相对离心力之间的换算，人们在式（3）的基础上制作了三者关系的列线计算图（如图 6-4）。图示法比公式法计算方便，由图中两者数值的点的连线，即得与第三者的交点，此即为所求第三者数值。

2. 离心时间 离心时间是由实验要求所决定。为了避免不稳定颗粒的凝聚、挤压损伤或变性失活，并使扩散所导致的区带加宽现象减弱，在保证分离的前提下，应尽可能缩短离心时间。相反，分离某些沉降较快的大颗粒时，为了达到预期的分离效果，往往使用粘度较大的梯度，以阻止颗粒的过度沉降，并延长离心时间。离心所用方法不同，离心时间也不相同。

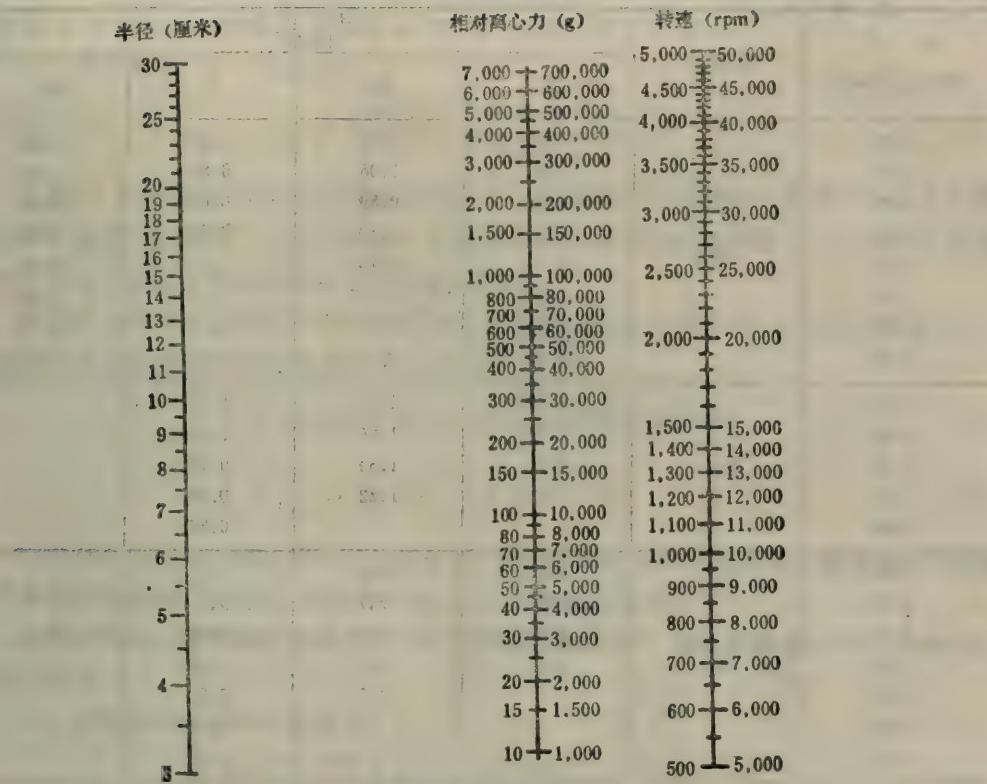


图 6-4 离心机转速与离心力的列线计算图

(1) 颗粒沉降时间的计算:

颗粒的沉降时间可用下面公式计算:

$$t = \frac{1}{S} \left[\frac{\ln r_2 - \ln r_1}{\omega^2} \right] \quad (4)$$

式中, t 为样品颗粒完全沉降到离心管底的时间(秒), 也叫澄清时间; S 为颗粒沉降系数; r_2, r_1 分别为旋转轴中心到离心管底部及样品液液面的距离(厘米)。

括号内的部分可用常数 K 表示。此时,

$$K = St \quad (5)$$

若 t 的单位用小时, S 以 Svedberg (S) 表示, 由于 $1 S = 10^{-13}$ 秒, 可得:

$$t = \frac{\ln r_2 - \ln r_1}{\omega^2} \cdot \frac{10^{13}}{3600} \cdot K \quad (6)$$

K 是转子的效率因子(通常 K 值为 10—1,000 或更大), 与转子大小和速度有关。 S, r_1, r_2 不变时, 由上述公式可以得出: (1) K 值越低, 颗粒沉降时间越短, 转子使用效率越高; (2) $\omega^2 t_1 = \omega^2 t_2$; (3) K 值与转速平方成反比, $\omega^2 K_1 = \omega^2 K_2$ 。转子出厂时都已标上最大转速时的 K 值, 由此可求得低速时的 K 值。有了 K 值就可估计具有一定沉降系数的某种颗粒的沉降时间。但文献或厂家所给 K 值均从离心管腔顶部而不是从液面计算的, 故实际 K 值比理论 K 值小。

如果颗粒接近圆球状, 但不知其沉降系数, 也可借助其它有关参数, 用下式估算颗粒

表 6-2 某些盐的密度梯度比例常数 β^0

密 度 (25°C, g/cm³)	阳 离 子	$\beta^0 \times 10^{-3}$ 阴 离 子			
		Cl⁻	Br⁻	I⁻	SO₄²⁻
1.20	Cs⁺	2.04	1.46	1.17	1.06
1.30		1.55	1.06	0.81	0.76
1.40		1.33	0.89	0.65	0.67
1.50		1.22	0.80	0.55	0.64
1.60		1.17	0.73		0.66
1.70		1.14			0.69
1.80		1.12			0.74
1.90		1.12			
1.20	Rb⁺	3.42	2.15	1.58	
1.30		2.76	1.56	1.19	
1.40		2.25	1.34	0.99	
1.50			1.22	0.90	
1.60				0.83	
1.05	Na⁺	28.7	12.8	8.7	
1.10		18.7	7.7	5.1	
1.15		15.8	5.9	3.80	
1.20		14.3	5.2	3.19	
1.25			4.5	2.86	
1.30				2.82	
1.35				2.95	
1.05	K⁺	22.1	11.3	7.9	
1.10		13.1	6.2	4.28	
1.15		10.1	4.6	3.44	
1.20			3.80	2.55	
1.25			3.36	2.21	
1.30			3.05	1.96	
1.35				1.73	
1.30	Li⁺	42.3	8.9		
1.40			9.1		
1.50			10.5		
1.60			11.4		
1.70			11.4		
1.80			10.0		

的沉降时间(秒):

$$t = \frac{16\pi}{2\omega^2 d^2 (\rho - \rho_0)} \frac{9\eta}{\ln \frac{r_2}{r_1}} \quad (7)$$

式中, d 为颗粒平均直径 (厘米); η 为介质粘度 (泊); ρ 、 ρ_0 分别为颗粒和介质密度 (克/厘米³)。

经验表明, 角式转子离心管内悬浮颗粒沉降到管底的时间比外摆式转子稍短, 但较易产生对流干扰。

(2) 颗粒平衡时间的计算: 上述离心时间的计算仅适用于沉降分离, 在密度梯度区

带离心中，颗粒到达平衡点所需时间的计算则要复杂得多。如在离子介质中进行平衡等密度离心，计算样品中颗粒在盐梯度中的平衡时间时，其方法如下：

(a) 样品和盐介质一起离心时，

$$t = \frac{1.13 \times 10^{14} \times \beta^0 \times (\rho - 1)}{n^4 r^2 S_{20,w}} \quad (8)$$

式中， t 为时间(小时)； β^0 为特定溶剂(水)中盐梯度的比例常数(见表 6-2)； ρ 为颗粒的浮力密度(克/厘米³)； $S_{20,w}$ 为 20℃ 时颗粒在水中的标准沉降系数(S)； n 为转子转速(rpm)； r 为平衡颗粒至旋转轴中心的距离(厘米)。

因为样品颗粒在盐梯度中的平衡区带是位于梯度的中间部分，故 r 值可用等浓点(与起始均匀盐介质密度相同的梯度中某一点)公式计算：

$$r_c = \left[\frac{1}{3} (r_1^2 + r_1 r_2 + r_2^2) \right]^{\frac{1}{2}} \text{ (外摆式转子用)} \quad (9)$$

$$\text{或 } r_c = \left[\frac{1}{2} (r_1^2 + r_2^2) \right]^{\frac{1}{2}} \text{ (区带转子用)} \quad (10)$$

公式(9)也可用于角式转子。必须注意，等浓点公式中的 r_1 是指梯度液面而言，如果管子未充满梯度液，则应经适当换算求出 r_1 (以缩短离心时间)。

此法计算的时间是颗粒平衡的时间(也即总离心时间)，形成盐梯度所需的平衡时间则要少得多。

(b) 用预形成的非平衡梯度时，

$$t = \frac{2.53 \times 10^{11} \times (\rho - 1) [\log (r_2 - r_1)/r_1 + 4.61]}{n^2 r S_{20,w} \times d\rho/dr} \quad (11)$$

式中， $d\rho/dr$ 为线性密度梯度的斜率(克/厘米³/厘米)； r_1 、 r_2 分别为梯度顶部和平衡底部与旋转轴中心的距离(厘米)；其余符号与式(8)相同。

公式(11)和(8)仅适用于相对粘度约等于 1 的梯度液(如 CsCl)，在粘度较大的溶液中，应对颗粒的沉降系数作适当校正。

此法虽用预先形成的梯度，但离心时仍存在梯度重新平衡、再分布问题，故也与平衡或稳定梯度所需的离心时间有关(总离心时间比(a)少)。

二、制备超离心的方法及其选择^[4,5,6,8]

制备超离心法可分为二大类型：(1) 差速离心法；(2) 密度梯度区带离心法。现分别介绍如下：

(一) 差速离心法

采用逐渐增加离心速度或低速和高速交替进行离心，使沉降速度不同的颗粒，在不同离心速度及不同离心时间下分批分离的方法，称为差速离心法。差速离心一般用于分离沉降系数相差较大的颗粒。

进行差速离心时，首先要选择好颗粒沉降所需的离心力和离心时间。离心力过大或离心时间过长，容易导致大部分或全部颗粒沉降及颗粒被挤压损伤。当以一定离心力在一定

的离心时间内进行离心时，在离心管底部就会得到最大和最重颗粒的“沉淀”，分出的“上清液”在加大转速下再进行离心，又得到第二部分较大、较重颗粒的“沉淀”及含小和轻颗粒的“上清液”。如此多次离心处理，即能把液体中的不同颗粒较好地分离开。此法所得沉淀是不均一的，仍杂有其它成分，需经再悬浮和再离心（2—3次），才能得到较纯颗粒。

差速离心法主要用于分离细胞器和病毒。其优点是：操作简便；离心后用倾倒法即可将上清液与沉淀分开；并可使用容量较大的角式转子。缺点是：（1）分离效果差，不能一次得到纯颗粒。（2）壁效应严重。特别当颗粒很大或浓度很高时，在离心管壁一侧会出现沉淀。（3）颗粒被挤压，离心力过大、离心时间过长会使颗粒变形、聚集而失活。

（二）密度梯度区带离心法（或简称区带离心法）

这是1940年发展起来的一种方法。区带离心法是样品在一惰性梯度介质中进行离心沉降或沉降平衡，在一定离心力下把颗粒分配到梯度中某些特定位置上，形成不同区带的分离方法。此法的优点是：（1）分离效果好，可一次获得较纯颗粒；（2）适应范围广。能象差速离心法一样分离具有沉降系数差的颗粒，又能分离有一定浮力密度差的颗粒；（3）颗粒不会挤压变形，能保持颗粒活性，并防止已形成的区带由于对流而引起混合。缺点是：（1）离心时间较长；（2）需要制备梯度；（3）操作严格，不易掌握。区带离心法又可分为差速-区带离心法（动态法或沉降速度法）和等密度离心法（平衡法或沉降平衡法）。

1. 差速-区带离心法 当不同的颗粒间存在沉降速度差时，在一定离心力作用下，颗粒各自以一定速度沉降，在密度梯度的不同区域上形成区带的方法称差速-区带离心法。差速-区带离心仅用于分离有一定沉降系数差的颗粒，与其密度无关。大小相同，密度不同的颗粒（如线粒体、溶酶体和过氧化物酶体）不能用此法分离。

离心时，由于离心力的作用，颗粒离开原样品层，按不同沉降速度沿管底沉降。离心一定时间后，沉降的颗粒逐渐分开，最后形成一系列界面清楚的不连续区带。沉降系数越大，往下沉降得越快，所呈现的区带也越低。沉降系数较小的颗粒，则在较上部分依次出现。从颗粒的沉降情况来看，离心必须在沉降最快的颗粒（大颗粒）到达管底前或刚到达管底时结束，使颗粒处于不完全的沉降状态，而出现在某一特定区带内。此时，离心管梯度液面上的样品层，由于颗粒沉降而变成了仅有溶剂分子的上清液。若样品液中含有大量沉降系数不同的颗粒（即浓度很大）时，也可能得到一条不同颗粒连续分布的区带。

在离心过程中，区带的位置和形状（或宽度）随时间而改变。因此，区带的宽度不仅取决于样品组分的数量、梯度的斜率、颗粒的扩散作用和均一性，也与离心时间有关。时间越长，区带越宽。适当增加离心力可缩短离心时间，并可减少扩散所导致的区带加宽现象，增加区带界面的稳定性，特别是较小的颗粒，沉降慢，易扩散，需用高速离心。

差速-区带离心的分辨率（不同区带相互间分开的清晰程度）比差速离心高，分辨率高低受颗粒沉降速度和扩散系数、实验设计的离心条件（样品带的宽度和浓度、离心力和离心时间，梯度斜率和长度、梯度介质的性质等）、离心操作的熟练程度所影响。梯度介质的摩擦阻力（或粘度）越大、颗粒沉降速度和扩散系数越少。沉降速度的大小还与颗粒的表面积、形状有关，大的、球形的颗粒比小的、长形的颗粒沉降得快；与颗粒和周围介质间的密度差及梯度上某一点的离心力成正比。若颗粒沉降速度差值小，就会影响分辨率，颗粒的扩散系数可改变区带宽度，也影响分辨率。操作中应尽量避免在装样、离心及取出梯度时扰

乱梯度。离心条件对分辨率的影响，将在有关部分叙述。

2. 等密度离心法 文献中有多种叫法，但均离不开“平衡”这两个字的含义，故也称平衡法。当不同颗粒存在浮力密度差时，在离心力场下，颗粒或向下沉降，或向上浮起，一直沿梯度移动到与它们密度恰好相等的位置上（即等密度点）形成区带，此即为等密度离心法。处于等密度点上的颗粒没有重量，区带的形状、位置均不受离心时间所影响，体系处于动态平衡。等密度离心的离心过程与差速离心、差速-区带离心的比较如图 6-5。

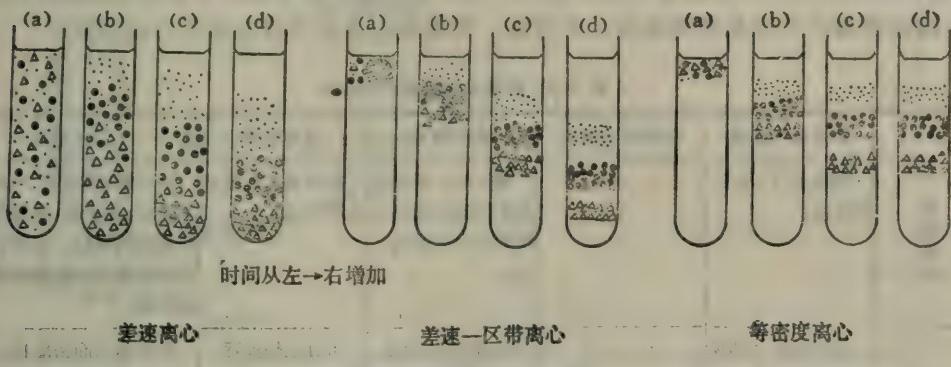


图 6-5 颗粒沉降过程的示意图

等密度离心的有效分离取决于颗粒的浮力密度差，密度差越大，分离效果越好，与大小和形状无关，但后二者决定着达到平衡的速度、时间和区带的宽度。颗粒的浮力密度不是恒定不变的，还与其原来密度、水化程度及梯度溶质的通透性或溶质与颗粒的结合等因素有关。例如某些颗粒容易发生水化，使密度降低；亲水梯度材料可能渗入颗粒，取代结构内的水化水而增加表观密度，分离时就要考虑这些因素的影响。

等密度离心的分辨率受颗粒性质（密度、均一性、含量）、梯度性质（形状、斜率、粘度）、转子类型、离心速度和时间的影响。颗粒区带宽度与梯度斜率、离心力、颗粒分子量成反比。低速离心虽可使颗粒沉降平稳，但不易建立平衡，需延时离心，有时要达数天之久。这会增加某些分子的扩散速度，使区带加宽，分辨率降低。所以等密度离心的转速一般较高。

根据梯度产生的方法可分为预形成梯度和离心形成梯度的等密度离心（后者又称平衡等密度离心）。前者需要事先制备密度梯度，常用的梯度介质主要是非离子型的化合物（如蔗糖，Ficoll）。离心时把样品铺放到梯度的液面上，或导入离心管的底部。平衡等密度离心常用的梯度介质有离子型的盐类、三碘化苯衍生物，还有 Ludox 等（后者扩散慢，最好用梯度产生器制备）。离心时是把密度均一的介质液和样品混合后装入离心管，通过离心形成梯度，让颗粒在梯度中进行再分配。离心达平衡后，不同密度的颗粒各自分配到其等密度点的特定梯度位置上，形成不同的区带。颗粒到达等密度点需要一定的离心时间，转速不够高，可以用延长时间来弥补，而提高转速可缩短平衡时间。大颗粒的平衡时间可能比梯度本身的平衡时间短，而小颗粒则较长。因此，离心所需时间应以最小颗粒到达平衡点的时间为基准。如果采用“松弛技术”，即先高速离心建立梯度，后降至原定速度维持6—8 小时，可大大缩短平衡等密度离心时间。

当已知某种颗粒的浮力密度时，也可不用梯度而进行等密度离心。方法是先在适当

速度下沉降，除去较重颗粒，然后把待分离颗粒的样品悬浮在与其浮力密度相同的介质中，离心直至所需颗粒沉降到管底。此法适于分离特定已知颗粒，用于多种颗粒的分离则很费事。

(三) 离心方法的选择

如上所述，差速离心、差速-区带离心的分离是依据颗粒的沉降速度差，等密度离心分离则依据颗粒的浮力密度差，二者互为补充。差速离心的关键在于选择离心力和离心时间，而区带离心关键是选择梯度及其范围。可见表 6-3 来选择合适的分离方法。

表 6-3 超离心分离方法的选择

	颗粒沉降系数	颗粒浮力密度	离心特点	分离效果	适用范围
差速离心	相差大(1-几个数量级)	—	短时间、多次采用不同速度和离心时间进行分段离心。	粗分离，纯度和收率不高。	分子量(或大小)相差大、不稳定、易变性、易受梯度介质损伤的颗粒。常用于从组织匀浆液中分离细胞器及分离病毒。
差速-区带离心	相差较少(20%或更少)。或分子量相差3倍的蛋白质。	—	短时间，低速度，样品不完全沉降。	可分出较纯颗粒。	大小不同而密度相似、受差速离心挤压变形、受低浓度梯度介质损伤较少的颗粒。一次分离量较少，宜作分析分离。可分离核酸、蛋白质、核糖体亚基及其它成分(如整细胞、脂蛋白)。
等密度离心	—	有差异。如相差0.005克/厘米 ³ 的DNA，相差0.01—0.02克/厘米 ³ 的亚细胞器。	长时间、高速度，颗粒完全沉降到平衡位置。其中平衡等密度离心多用较低转速(3—4万rpm)、较长时间(2—3天)。	可分出较纯颗粒。	大小相同而密度不同、稳定、不受高浓度介质损伤的颗粒。一次分离样品量大，用于制备及分析分离。可分离核酸、亚细胞器、整细胞，也可分离复合蛋白质，但简单蛋白质不适用。

选择分离方法必须注意以下几点：

(1) 区带法分离颗粒的能力由大小或密度所决定。沉降系数和浮力密度都相同的颗粒，经处理后也可用超离心法分开。常用方法是改变梯度的组成(如加入少量无机盐或另一种梯度材料以改变渗透性、促进颗粒的结合作用等)及有选择损伤某种颗粒从而影响颗粒的浮力密度和沉降系数。

(2) 颗粒在一定溶剂或介质中都有其特征的沉降系数和浮力密度(如图 6-6)，可以从文献或手册中查得。已知分子量的某些大分子，可用经验公式计算(如表 6-4)。哺乳动物细胞主成分的沉降系数(S)近似为：可溶蛋白 1—25，RNA 4—30，DNA 20—100，核糖体亚基 30—60，核糖体 70—80，聚核糖体 100—400，微粒体 100—1.5×10⁴，质膜 100×10⁵，溶酶体 1×10⁴—2×10⁴，线粒体 2×10⁴—7×10⁴，细胞核 4×10⁶—10⁷。必要时，也可参考同类颗粒或经反复试验求出。然后由所得数据列表或作 S—ρ 图，从中确定分离的最佳方法和条件。

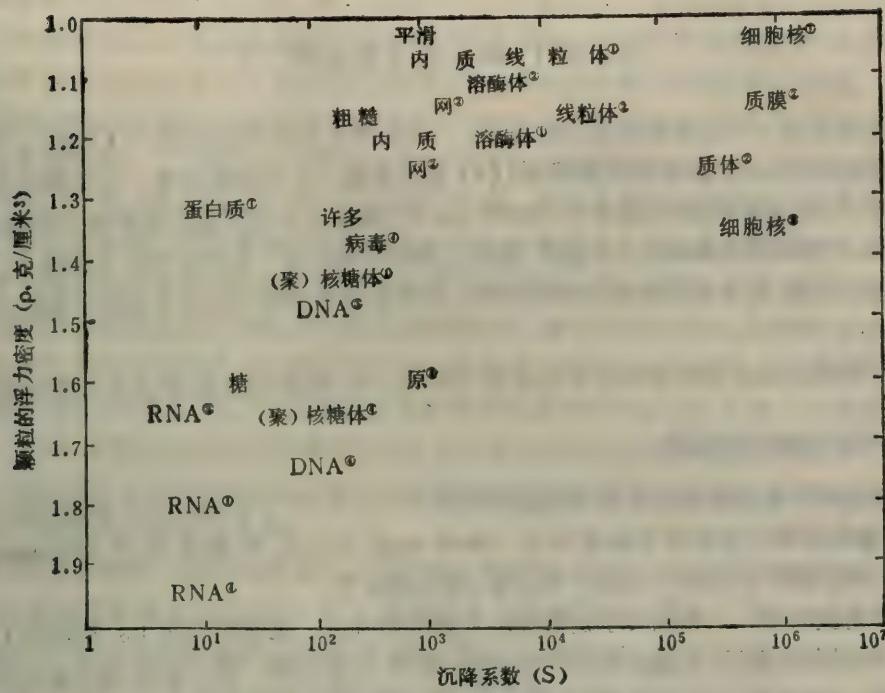


图 6-6 某些细胞成分和大分子的 $S-\rho$ 图

(1) 在水或 0.25 M 蔗糖中; (2) 在蔗糖液中; (3) 在 Cs_2SO_4 中; (4) 在 CsCl 中。

(3) 制备超离心分离颗粒的分子量为 10^6 以上 (或直径 20 微米以上)，小于 10^6 的颗粒分离效果不好，小分子核酸、蛋白质、多肽等在目前实验室所用离心力下还无法分离，还须寻求其它分离技术 (化学处理、分子筛、超滤、聚丙烯酰胺电泳等)。

(4) 高密度的颗粒可用盐介质进行平衡等密度离心分离。含脂颗粒可利用其沉降速度差进行差速-区带离心分离 (样品铺放在梯度顶上)，或用浮力密度差进行等密度分离 (样品分布在梯度底部)。

(5) 同种颗粒由于其不均一性，沉降系数或浮力密度可能变动很大，分离时容易出现相当宽的区带或发生不同颗粒区带的交错重叠。核酸、核蛋白、蛋白质均存在分子的不均一性，如哺乳动物 DNA 在 CsCl 中的浮力密度为 $1.68-1.72$ 克/厘米³。细胞和细胞器的非均一性更甚。

(6) 分离方法的灵敏度与操作有关。熟练的操作者用差速-区带法可分离沉降系数相差 5% 的颗粒，而初学者往往只能分离相差 20—30% 的颗粒。

表 6-4 某些生物大分子沉降系数的经验计算公式

公式	分子类型	分子量范围
$S_{20,W}^0 = 0.00242M^{0.667}$	蛋白质	$1.7 \times 10^4 - 4.9 \times 10^7$
$S_{20,W}^0 = 2.8 + 0.00834M^{0.479}$	双链线性 DNA	$10^6 - 10^8$
$S_{20,W}^0 = 0.0528M^{0.4}$	单链碱性 DNA	$1.5 \times 10^6 - 7 \times 10^7$
$S_{20,W}^0 = 0.0105M^{0.549}$	单链中性 DNA	$1.5 \times 10^6 - 7 \times 10^7$
$S^0 = 2.7 + 0.1759M^{0.445}$	双链环状 DNA	$3 \times 10^6 - 3 \times 10^7$
$S^0 = 7.44 + 0.00243M^{0.58}$	双链超螺旋 DNA	$10^6 - 3 \times 10^7$

三、转子、离心管及其选择^[4,5,11]

制备超离心机的结构装置比较复杂，一般由四个主要部分组成：(1) 转子；(2) 传动和速度控制系统；(3) 温度控制系统；(4) 真空系统。其结构特点是：有完善的冷却和真空系统，以消除摩擦热（转速大于 20,000 rpm 时，摩擦生热很严重），保护转子和离心样品；有精确、严格的传动系统，以及速度、温度监测和控制系统，此外还有防过速装置、润滑油自动循环系统、电子控制装置和操纵板等，以保证操作安全、自动化和获得最好的离心效果。

与制备超离心使用密切有关的是转子和离心管，现将其结构、性能及用途介绍如下。

(一) 转子和转子的选择

离心转子是当代离心机发展的重要内容之一，自 50 年代起至今已有近百种转子出现。制备用转子主要分为角式转子 (fixed angle rotor)、外摆式转子 (Swinging-bucket rotor) 和区带转子 (zonal rotor) 等三类，现介绍如下：

1. 角式转子 角式转子是指离心管腔与转轴成一定倾角的转子。角式转子的型号因管子的倾角、数目、容量以及转子的材料、半径、转速而异。管子的倾角对离心沉降有很大影响，角度愈大，沉降愈结实，分离效果愈好。角度小，颗粒沉降距离短，沉降速度快，但不结实，分离效果差。角式转子的重心低，运转平衡，寿命也较长。

颗粒在角式转子中沉降时，先沿离心力方向撞向离心管（如图 6-7），然后再沿管壁滑向管底。因此管的一侧就会出现颗粒（尤其大颗粒）沉积，此现象称“壁效应”。“壁效应”容易使沉降颗粒受突然变速所产生的对流扰乱，影响分离效果，尤其在分离沉降特征相似的颗粒时更为显著。用于区带离心时，颗粒区带在减速后需要重新定向，定向后管下部区带变窄，上部区带变宽。

2. 外摆式转子 转子活动管套内的离心管，旋转时随着转子的运动，从垂直悬吊上升到水平位置（约 200—800 rpm 下），这种转子称为外摆式转子。外摆式转子的结构较复杂，也有管数、容量、材料、半径、转速等的差别。

颗粒在外摆式转子中的沉降情况与角式转子的不同，是沿管子方向沉降的。梯度离

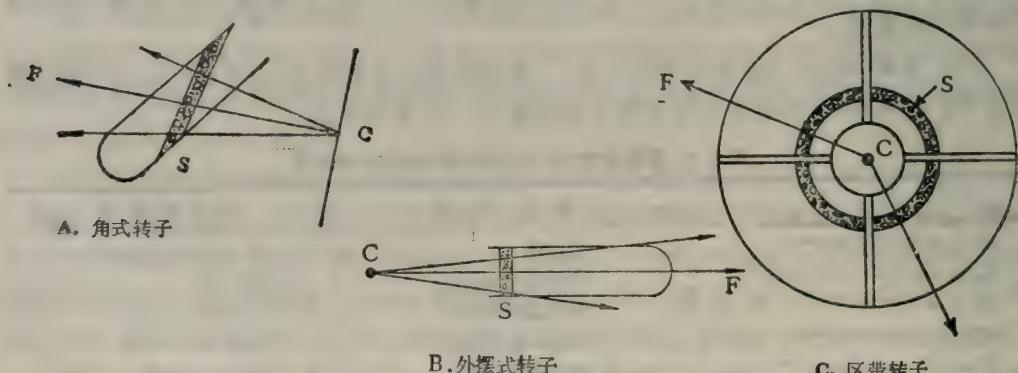


图 6-7 颗粒在不同转子中的沉降情况
(S 样品带； C 旋转中心； F 离心力)

心中颗粒沉降区带横过离心管，离心后区带不必重新定位。由于颗粒在离心力场中沿离心力方向散射地运动，而不是按平行线沉降（图 6-7B），只有处于样品区带中心的颗粒才直接向管底沉降，其它颗粒则撞向管的两侧，产生类似角式转子的“壁效应”现象。颗粒也受振动和变速扰乱，但对流现象要小得多。

3. 区带转子 区带转子主要由一个转子桶和可移动的顶盖组成。桶中心位于转子的旋转轴上，转子桶中装有叶片状（或隔板）装置，把转子内部分隔成四个或多个扇形小室。叶片上有导管，梯度液或样品液从转子中央液管泵入，通过这些导管分布到转子四周。转子内的叶片装置可防止样品或梯度受突然变速时产生涡流，有改善分离效果的作用。这种转子的缺点是：样品和介质直接接触转子，耐腐蚀要求较高，操作较复杂。

区带转子的型号很多，自 1964 年至今已发展到 40 种以上，但制备上广泛应用的仅几种（如 B-XIV、B-XV 等）。一般按其结构和应用特点可分为 A、B、J、K……；按操作方式分为分批式（又有动态和静态装放料之分）和连续式；按转速可分高速和低速等。有些区带转子还可和光学系统连用，用于离心监测和扫描记录。各种转子的结构、性能和用途可以从有关专著或转子手册中查得。

颗粒在区带转子中的沉降情况不同于角式和外摆式转子，在径向的散射离心力作用下，颗粒的沉降距离不变（如图 6-7C）。因此区带转子的“壁效应”极小，可避免低速晃动所造成的区带或沉降颗粒的扰乱，分离效果好。而且还有转速高、容量大，回收梯度容易和不影响分辨率的优点，使超离心用于制备和工业生产成为可能。

区带转子除了在沉降特点、“壁效应”上与以上二类转子有明显差异外，还有如下不同之处（表 6-5）。

表 6-5 三类转子结构上的比较

	管 数	管子容量	管子与转轴的角度
角式转子	4—12（多达几十、上百）个	0.2—500 毫升	14—45°
外摆式转子	3—6 个	5—25（多至 70）毫升	静止时 0°，离心时 90°
区带转子	有一转子桶，无离心管。	转桶容量 300—1700 毫升（多至 8 升，连续式可分离几十升）	桶中心位于转轴上。

4. 转子的最大允许速度 任何转子都有一定的使用速度和使用限度，随着使用时间和次数的增加，转子长期疲劳必然引起运转速度下降。所以使用转子时，必须设立档案，记录每次的使用时间。一定时间或次数后，应重新估算其最大允许速度，以保障使用安全。各制造厂生产的转子均已标明其保证使用期限。如 Beckman 转子可保证在最大转速下使用 1,000 次或 2,500 小时或 5 年，此后转速降低 10% 后又能再用 1,000 次或 2,500 小时。但转子的使用保证仅适用于完好的转子。

由于最大额定转速是以装载好的离心管的重量为依据的，影响离心管重量还有管子及管帽材料和样品或梯度液重量等因素，所以为了便于安全操作，必须估算某一特定重量离心管的最大允许转速。上述因素和转子最大允许转速间有如下关系：

$$N' = N \sqrt{\frac{W_A}{W_B}} \quad (12)$$

式中, N' 为最大允许转速; N 为最大额定转速; W_A 为注满了平均密度为 1.2 克/厘米³ 溶液的塑料离心管加硬铝帽的总重量; W_B 为操作时所用离心管加管帽及溶液后的总重量。

如果离心管、帽不变,但样品液和梯度液的平均密度 ρ 大于 1.2 时,应降速运转,其最大允许转速应为: $N' = N \sqrt{\frac{1.2}{\rho}}$ 。

5. 转子的选择 制备用超离心机附有各种转子以供选择。例如贝克曼公司生产的 L8 系列超速离心机就配备有角式、垂直、外摆式、区带和连续流动式等 43 种转子。在超离心制备中,转子的选择可结合分离的目的、要求和方法,从转速、容量和形状等三方面考虑。

(1) 转速: 转子通常可用钛合金(钛铝合金)、铝合金(铝镍合金)或塑料做成。低速运转用塑料转子,中速运转可用铝合金转子,而高、超速须选用钛合金转子。

塑料转子(如聚氧苯、有机玻璃,聚四氟乙烯)的固有弱点是强度低,使用速度仅限于 6,000 rpm 以下。铝合金具有轻便、价廉、易加工、有一定强度和抗爆性能等优点;但不能加热消毒、易氧化、抗化学腐蚀性差(易为酸碱及 CsCl 等盐类腐蚀,仅在中性或生理 pH 6.5—7.5 下使用)。此外,抗金属疲劳损伤的性能也差。高速运转时,铝转子会出现金属疲劳,易受应力影响而损伤其晶体结构,导致水进入微晶界面,加重裂缝的扩展(这种现象称应力腐蚀或应变损伤)。化学和应力腐蚀均会造成运转失衡,酿成事故。

钛合金转子虽然价格昂贵、加工困难,内含的铜会抑制一些酶活,也比较笨重;但它强度大、耐用,能经受冷冻及高温消毒处理,抗化学腐蚀(如 CsCl、pH3.5—11 的酸碱液)和应变侵蚀的性能强,是当前最理想的转子。由于钛转子的强度大,同样大小转子的抗离心力的能力要比铝转子大二倍左右,并至少可增加最大允许转速 20%。

转子的型号、来源不同,转速也不同。久用的转子受化学或应力腐蚀,须重新估算最大允许转速。任何转子都不允许在满额或超额定转速下运转。有人建议使用转速为最大额定转速(或最大允许转速)的 75%,以保证安全,延长使用寿命。角式转子的转速除受转子材料强度限制外,也受离心管的塑料强度限制。

(2) 形状: 转子的形状可直接影响颗粒的分离效果。区带转子具有与外摆式转子相同或稍好的分辨率;既能进行区带离心,也能进行差速沉降。但颗粒沉降区带随半径增大而被径向稀释,故一般不用于浓缩,仅适于分离纯化。区带转子的分辨率与转子的高度/直径之比呈反比关系。

外摆式转子主要用于区带分离。等密度离心选用粗短离心管;而差速-区带离心选用细长离心管的外摆式转子。

角式转子不能用于差速-区带分离,加减速期间样品或颗粒区带易被扰乱,通常在差速离心中作组分的粗分。但在差速分离有显著沉降系数差的样品时,效果却很好。用在等密度离心,尤其在平衡等密度离心时,由于沉降距离短,梯度和颗粒容易建立平衡。但所用的梯度密度范围小,多用于分离 DNA 一类颗粒,分离效果比外摆式转子好。而且在 CsCl 中, RNA 沉积于管外壁,不妨碍用穿刺法取出 DNA 区带。

还有一类垂直管转子,它是角式转子的特殊形式,主要用作等密度离心。其优点是颗粒移动距离短,梯度离心时,约比外摆式和角式转子各节省 4/5—2/3 及 1/2—2/3 的时

间。但转子须承受很大的与管子成垂直作用的离心力，速度的剧变容易产生对流扰乱。

(3) 容量：转子的容量依次是区带转子>角式转子>外摆式转子，每一类型的转子也有大小之分。区带转子不仅容量大，有些还有连续流动装置或光学监测系统，很适于大规模分离制备。角式转子用于差速离心分离时，由于每次处理样品多，离心时间短，可增加样品的处理次数和体积。

(二) 离心管及其选择

离心管通常由玻璃、塑料和金属(如不锈钢、铝合金)制成。玻璃管虽质硬，但很脆，不能耐受超速离心的应力。超离心所用离心管主要用塑料和不锈钢制成。

塑料离心管常用的材料有聚乙烯(PE)、醋酸-丁酸纤维素(CAB)、聚碳酸酯(PC)、聚丙烯(PP)、硝酸纤维素(NC)等。塑料管的最大优点是透明(或半透明)，硬度小，可用穿刺法取出梯度。某些管子还具有良好的物理性能，如抗张力、耐高(或低)温等，可经受高温消毒、冷冻、超速离心等不同处理。其主要缺点是易变形，抗腐蚀性差，使用寿命短。

不锈钢离心管强度大，不变形、能抗热、抗冻、抗化学腐蚀。但使用时也应避免接触强腐蚀性的化学药品，如 HCl、H₂SO₄、HF 等。在某些特殊场合下，也可使用塑料衬里的不锈钢管。

离心管的选择主要从容量、强度、抗温变、抗化学腐蚀等方面考虑。此外，高速离心的应力还会加剧介质对管子的腐蚀。因此，必须根据制备离心的不同要求(体积、转速、介质等)选择相应的离心管。选择管子的最好办法是查阅有关管子的资料或产品说明书，并在离心前测试梯度介质或样品对离心管稳定性的影响。制备超离心普遍采用不锈钢管；塑料管则主要用于区带离心。选用塑料离心管时，管子的大小须与梯度液或样品液相适应。未充满液体的管子(甚至拉力强度较大的 PC 管)应降速使用；在角式转子中高速离心时，管壁受压不匀将引起管子变形或崩裂。上下密度差较大的梯度管，也容易发生类似的离心变形，使转子不平衡而造成严重事故。有些管子(如 NC 管、PP 管)即使充满液体，也不能在 5 万 rpm 以上转速下离心。超速离心宜选用不锈钢管、厚壁塑料管、polyallomer(PA，丙烯和乙烯单体的共聚物)管。严禁使用显著变形、损伤或老化的离心管。另外，还应了解管子的容量、最高转速、使用次数、保存方法等，以便合理使用。薄壁管在 6.5 万 rpm 的高速下仅用一次，4—6 万 rpm 下可用 3—5 次。厚壁管使用次数可多些。

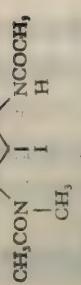
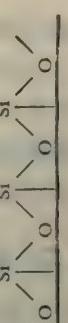
此外，还要考虑介质对管子(如前述)或管子对分离颗粒的影响，例如某些塑料管(如硝酸纤维素管)的表面会吸附核酸，管子的长短、大小等也要适当注意。如外摆式转子用细长管作差速-区带离心可获得较高的分辨率；薄壁管仅用于外摆式转子；角式转子及垂直转子用的管子承受的压力大，须用厚壁离心管等等。

(三) 离心管帽

超速离心机的离心管常附有管帽。离心前管子必须戴好管帽。管帽有三种作用：(1) 防止样品外泄。用于生物危险、放射性或腐蚀性的样品时，这点尤其重要。(2) 防止样品挥发。样品暴露于真空时，很容易挥发，使转子失衡运转而发生事故。(3) 支持离心管，防止离心变形。

管帽一般由塑料、电镀铝合金或不锈钢制成，内衬橡胶密封垫圈。

表 6-6 各类梯度介质的优缺点

介 质	优 点	缺 点	例 子	说 明
碱金属盐 (Cs、Rb、K、Na 盐)	溶度大;粘度小(相对粘度约等于 1);扩散快,可离心形成梯度;稳定。	离子强度大;渗透压高;铯盐价格昂贵;碘化物有紫外吸收,易氧化;高浓度重金属盐低温会析晶。	常用 CsCl,其次为 Cs ₂ SO ₄ ,此外还有 NaBr、NaI 等。	CsCl 常含紫外吸收物质和重金属杂质。
亲水的小分子有机物 (单、双糖、甘油等)	稳定,惰性;便宜;密度一般较大。	高浓度(如蔗糖、甘油在 1.1—1.15 克/厘米 ³)和低温下粘度大;渗透压高(甚至在 1.05 克/厘米 ³ 的低浓度下);不易离心形成梯度;抑制酶活(高浓度蔗糖,甘油起稳定剂作用,但也抑制一些酶);高度水化;醇类不能消毒处理。	常用蔗糖,其次为甘油、葡萄糖、甘露糖。	蔗糖常含核糖酶、紫外吸收物质和重金属。甘油很纯,不含核酸酶活。
高分子有机物 (多糖、蛋白质)	渗透压低;不穿透生物膜;不抑制酶;稳定性;惰性;蛋白质可保护酶活和细胞的完整。	渗透度一般较小;粘度很高;扩散慢,不能离心形成梯度;多糖容易被样品中某些水解酶水解;多糖颗粒能被某些细胞吞噬或引起某些细胞聚集;不能消毒处理;高度水化。	多用 Ficoll,此外有葡聚糖、糖原、牛血清蛋白等。	Ficoll 是蔗糖和环氧氯丙烷共聚物,分子量不等,现有 400,000 及 70,000 两种。常含低分子杂质。
三碘化苯衍生物	兼有糖类、碱金属卤化物的优点。稳定;惰性(如 Metrizamide 在 pH 2.5—12.5 室温下长期稳定);溶度大;既可离心形成梯度,也可预制梯度。	渗透压较高;抑制某些酶活;有紫外吸收;有一定离子强度(除 Metrizamide 外): Metrizamide 高浓度下(1.3 克/厘米 ³)粘度较大;干抗某些测定方法。	多用 Metrizamide	MW = 789 
胶态 SiO ₂ (商品名 Ludox)	稳定(与 pH 有关,不同 Ludox 的稳定性不同);相当惰性;粘度及渗透压低;可离心形成梯度(但扩散较慢)	长时高速下胶态 SiO ₂ ,颗粒聚合沉降;有紫外吸收及光散射性;多数对冻结和融解敏感; SiO ₂ 颗粒可被细胞吞噬;抑制某些酶活。		其中 Ludox HS 结构为 $\text{Na}^+ \text{O}^- \text{Si}(\text{O})_3 \text{Si}(\text{O})_3 \text{O}^- \text{Na}^+$ 

四、梯度、梯度介质及其选择^[4,5,15]

(一) 梯度介质

常用梯度介质可分为五类，各类介质的优缺点如表 6-6。

市售的梯度材料均含有杂质，影响分离或测定，用前必须进行精制，除去杂质。例如重金属可用 EDTA (1—10 mM) 或 Dowex 聚合树脂 (1/20—1/10 体积) 除去；紫外吸收物质可用酸处理过的活性炭 (1/40—1/20 重量) 煮沸一段时间后吸附除去；核酸酶可用活性炭或焦碳酸二乙酯进行处理；高分子介质所含低分子杂质可透析除去。

(二) 梯度介质的选择

理想密度梯度材料的条件是：(1) 溶度足够大，能形成颗粒分离所需的有效密度。常见梯度介质的最大密度见表 6-7；(2) 溶液稳定、惰性、渗透作用小、粘度和离子强度低，不损伤待分离组分；(3) 不干扰组分分析；(4) 具有某些特性（如折射率）以便于测定其浓度或密度。此外，还应考虑纯度、价格、毒性、腐蚀性和水化作用，能否除去或回收，能否加热消毒等因素。

表 6-7 常见梯度介质的最大密度 (20°C)

材 料	密度(克/厘米 ³)	材 料	密度(克/厘米 ³)
蔗糖	1.33	乙酸铯	2.00
甘油	1.26	RbCl	1.49
葡萄糖	1.13	RbBr	1.68
Ficoll	1.16—1.45	RbI	1.95
牛血清白蛋白	1.12	甲酸铯	1.85
三氯乙醛水合物	1.91	NaBr	1.53
重水	1.105	NaI	1.90
Ludox	1.219	甲酸钠	1.32
Metrizamide	1.46	KBr	1.37
Urografin	1.45	KI	1.72
Renografin	1.45	甲酸钾	1.57
CsCl	1.91	乙酸钾	1.411
Cs ₂ SO ₄	2.01	酒石酸钾	1.485
CsBr	1.72	柠檬酸钾	1.485
CsI	1.65	LiBr	1.83
甲酸铯	2.10	Ludox-葡萄糖	1.25

注：用重水代替水作溶剂，通常最大密度可增加 0.05—0.08，并可使粘度下降。低温影响溶解度，密度也相应降低。

实际上不存在适用于所有颗粒分离的理想梯度材料，常用材料都有一定的局限性。几类梯度材料的应用见表 6-8。下面简单介绍梯度介质材料的性质和应用。

1. 碱金属盐^[12,16,19] 盐梯度介质主要用于平衡等密度离心，分离 RNA、DNA 或核酸占优势的病毒颗粒。由于核酸的浮力密度大，不能选用蔗糖、Ficoll 等梯度材料，须用溶度大、能形成高密度液的盐类。RNA 的分离几乎全用 Cs₂SO₄，理由是：(1) RNA 不溶于浓 CsCl，离心时在管外壁沉淀；(2) Cs₂SO₄ 溶解度比 CsCl 大，形成梯度的斜率比 CsCl 大

表 6-8 几类梯度材料的主要应用

梯度材料	大分子	核蛋白	亚细胞器	细 胞	病 毒
单糖或双糖	—	一些	+	—	+
多糖	—	—	+	+	+
三碘化苯衍生物	+	+	+	+	+
胶态 SiO_2 (Ludox)	—	—	+	+	+
CsCl	+	一些	—	—	+

“+”表示可用，“—”表示不用。

二倍，适于浮力密度很宽的不同核酸分子的分离；(3)核酸在 Cs_2SO_4 中的水化程度比在 CsCl 中大，使浮力密度大为降低，也即降低了所用梯度的盐浓度；(4) CsCl 在水中的密度低温下约为 1.7 克/厘米³，已接近溶解度的极限，不能产生足够密度以分离 RNA。虽然 Cs_2SO_4 对某些单链 RNA 分子有聚合、沉淀作用，但仍可用于其它单链 RNA、双链 RNA 和 RNA-DNA 杂交分子的分离。

DNA 的浮力密度较小，普遍用 CsCl 来分离。 Cs_2SO_4 离心形成的梯度斜率大，分辨率比 CsCl 差，而且 SO_4^{2-} 能与闪烁剂沉淀，妨碍同位素标记物的测定，故一般不宜作 DNA 分离的梯度介质。 CsCl 分离 DNA 的优点是分辨率好；DNA 在浓 CsCl (7M) 中也溶解；天然 DNA 在中性 CsCl 中的浮力密度还与其 GC 含量呈现出近似线性的关系 ($\rho = 0.098 \times \text{GC\%} + 1.660$)，而用 Cs_2CO_4 则观察不到这种关系。

核酸在 Cs_2CO_4 和 CsCl 中的浮力密度依次为 RNA > RNA-DNA® > 变性 DNA > RNA-DNA® > 天然 DNA (杂交分子的浮力密度随组成而改变)。核酸的浮力密度会受到某些因素的影响。DNA 的浮力密度与以下因素有关：(1)在盐介质中的水化程度。已利用水化程度的不同而分离单、双链 DNA。(2)螺旋度。利用在 CsCl 或 Cs_2SO_4 中加入溴化乙锭而影响 DNA 的浮力密度。螺旋度大的，结合染料少，浮力密度降低就不明显。(3)碱基组成。天然 DNA 的 GC 含量、碱基的修饰、同位素标记等对密度均有影响。

铯盐介质也用于病毒及某些复合蛋白(如血清脂蛋白、mRNA 蛋白、核 RNA 蛋白等)或经特殊处理的核蛋白的分离，但盐介质所产生的高渗透压和高离子强度对少数病毒及多数复合蛋白的稳定性不利，可能会导致结构改变而丧失感染活性。

分离核酸类物质也用其它盐类，但缺陷更多，仅在特殊情况下使用。如某些动物病毒在酒石酸钾梯度中相当稳定，分离效果比 CsCl 好。 NaI 可用于分离核酸， NaBr 则专用于分离脂蛋白等。

2. 小分子有机物 单、双糖梯度主要用于差速-区带离心。最常用的是蔗糖，梯度范围是 5—20% (大分子及小颗粒)或 15—30% (具膜颗粒)。蔗糖有对多数病毒安全，无损伤、浮力密度低(在 CsCl 中浮力密度为 1.38 的病毒，在蔗糖中为 1.20)等优点。除少数病毒外(如 f_2 噬菌体，80 S)，多数病毒的沉降系数为 120—1,000 S。使用蔗糖梯度时，通常在 90,000—420,000 g 下离心 0.5—3 小时即可。

蔗糖也常用于亚细胞器、某些 RNA、DNA 和核蛋白的分离，但分离亚细胞器时，颗粒完整性可能受到一些影响。

如果待分离样品液含有蔗糖酶或蔗糖干扰某些酶的测定时，可用甘油代替蔗糖。甘油在性质上类似蔗糖，但可保护酶活，能高压消毒，易蒸发除去。

3. 有机高分子 多糖、白蛋白等渗透压低，适于具膜颗粒的差速-区带和等密度离心分离。许多动植物、微生物的细胞、亚细胞器和病毒已成功地用多糖介质进行分离，颗粒经分离后，一般损伤极小，但高浓度下多糖的渗透性增加，易使细胞失活，故不常用于活细胞的等密度分离。差速-区带离心却可获得相同或更为有效的结果，而且时间短，转速低，其中最为广泛使用的是聚蔗糖和牛血清白蛋白。生物颗粒在多糖中高度水化，其浮力密度比在蔗糖中低。

高浓度的大分子梯度介质，对颗粒损伤比蔗糖小，但成本较高、溶度较小，而且粘度高，需要延长离心时间，不宜用于小颗粒的分离，应用上并不优于蔗糖。

4. 三碘化苯衍生物 复合蛋白质对高离子强度敏感，容易引起结合键的断裂或亚基解离。分离这类复合物须选用非离子型的梯度介质。最常用的三碘化苯衍生物是非离子型的 Metrizamide，有时也用蔗糖。Metrizamide 不解离核蛋白，但其它三碘化苯衍生物均为弱离子型，会影响核蛋白组成，应用上受到一定限制。

三碘苯衍生物也能用于分离核酸、蛋白质、病毒、亚细胞器和细胞等，许多成功的例子已显示出它的潜在作用。

颗粒在三碘苯衍生物中的浮力密度与介质本身有关。DNA 在 Metrizamide 中的浮力密度为 1.12 克/厘米³，接近完全水化时的密度；而在离子型三碘苯衍生物中，密度还稍大些。改变 Metrizamide 的离子强度或 pH 也能改变 DNA 的浮力密度。多数三碘苯衍生物能与蛋白质牢固结合，使浮力密度增大达 1.30 克/厘米³ 以上。采用重水作溶剂或将样品分层到梯度顶上，或用较低浓度的 Metrizamide（弱结合）、Urografin（不结合）可减弱或排除这种结合作用。蛋白质、复合蛋白质在 Metrizamide 中的浮力密度约为 1.27 和 1.22 克/厘米³。

三碘苯衍生物几乎可用于任何颗粒的分离，是很有前途的一类介质。

5. 胶态 SiO₂ (Ludox) 具膜颗粒对渗透压敏感，不能用高渗透性的盐类、蔗糖或高粘性的 Ficoll、Metrizamide 来分离。粘度高，沉降慢，离心时间长也易引起不稳定颗粒的破坏或变性。Ludox 的渗透压和粘度均很低，是分离不稳定颗粒的理想介质。但 Ludox 在 pH 4—7.5 不稳定，对细胞有低毒性，须与多聚体（如葡聚糖、聚乙二醇）配成混合梯度介质后才适用，或采用新型号的 Ludox（如 MCS 的 I、II 型）。Ludox MCS 不仅保留了胶态 SiO₂ 的优点，而且避免了加多聚体所带来的弊病，在渗透性、pH、离子强度上接近细胞的生理条件，是一种很有前途的材料^[20]。

颗粒在 Ludox 中的浮力密度较低，大部分细胞器小于 1.10 克/厘米³（在蔗糖中则达 1.15—1.2 克/厘米³），细胞器分离常用介质是溶于 0.25 M 蔗糖的 Ludox。

选择梯度介质还要考虑介质的稳定性。Ludox 在高速下（> 100,000g）会出现 SiO₂ 颗粒沉淀，只能分离沉降速度比 SiO₂ 颗粒快的较大颗粒，不宜分离大分子或大分子复合物（如染色体）。大量制备还要考虑材料的成本，来源及回收等。

如一时找不到合适的材料作梯度介质，或颗粒不稳定，不能用高粘度介质时，也可用混合材料作介质。混合材料的梯度在等密度离心中已得到广泛应用，如 40% Ludox 和多糖的梯度常用于完整细胞的分离。

(三) 梯度的选择

梯度的作用是使颗粒沉降稳定或稳定颗粒区带界面，防止因局部温度变化或机械震动产生的对流扰乱而影响分离效果。在区带离心中，梯度的有效密度范围、梯度的斜率、形状和容量的选择是颗粒分离的关键。

1. 梯度的形状 梯度可按其形状分为五种类型：直线形(或线性)、凸形(或指数型)、凹形(或对数型)、阶梯形和复杂梯度。

超离心制备常用线性梯度。差速-区带离心一般用预形成线性梯度；等密度离心则可用预形成或离心形成的线性梯度。预形成梯度一般用于：(1)不稳定的颗粒；(2)扩散慢，不易离心形成梯度的介质；(3)沉降快的大颗粒(细胞、细胞器等)。当颗粒在高速下离心18小时(或18小时以下)后，能清楚分成区带时，可用预形成线性梯度。因离心形成梯度时，梯度介质经长时离心后重新分配，梯度形状会发生改变。

有时为了某种分离需要，也采用某些特殊形状的梯度。阶梯梯度用于颗粒区带很靠近、连续梯度难分开的场合，最适于亚细胞器、整细胞、某些病毒分离，具有梯度容量大，分离迅速、效果好的优点。主要用于等密度分离，有时也用于差速-区带离心。使用阶梯梯度须有线性梯度的分离数据作依据。凹形梯度常用于低密度颗粒(如脂蛋白)的上浮等密度分离；凸形梯度则用于较高密度颗粒的沉降等密度分离。通常都采用长离心管，以提高较低密度区(凹形)或较高密度区(凸形)的分辨率。复杂梯度可同时用混合物中颗粒的沉降系数差和密度差。这种混合物一般需依次经颗粒密度差及沉降系数差二步离心分离(或反之)，采用复杂梯度，一次即可得较彻底的分离，简化了分离步骤。沉降系数或密度范围很宽(即同种颗粒大小不均一)的颗粒，用复杂梯度往往也能与其它颗粒很好分开。

线性梯度的缺点是离心力随管长(或半径)增加，无法抵消粘度增加对沉降速度的影响，使颗粒的沉降变慢，影响了梯度下部分的分辨率。为了使粘度与离心力的增加相平衡，让颗粒作恒速运动，有人在外摆式和区带转子的差速-区带离心中使用了等动力学和等体积梯度，但制备上除常用的5—20%蔗糖梯度外，其余实用价值不大。

2. 梯度的密度范围 线性梯度上下密度比为1/4最好。差速-区带离心所用梯度的密度范围小，其最大密度(即底部密度)小于样品液中所有颗粒的密度。这种梯度的作用既可以使大小不同的颗粒在离心力场下往管底沉降，又能防止对流，维持沉降稳定，使颗粒不致很快降到管底，从而有足够时间形成区带。还能避免某些颗粒形成等密度区带，而与其它颗粒的沉降区带相混淆。等密度离心所用梯度的密度范围较大，包括样品液中所有颗粒的密度在内。梯度的最大密度要大于样品中所有颗粒的密度，防止某些颗粒在没有等密度点稳定的情况下，继续往下沉降，造成与其它等密度区带重叠，影响分离效果。

选择梯度的最小密度(即梯度顶部的密度)的依据是，它必须能支持样品液，并在未离心前尽可能减少颗粒的沉降，又必须具有分离所要求的最小密度和粘度，以使离心迅速。因此，梯度顶部的密度必须比样品液的大。在分离具膜颗粒(细胞或细胞器)时，为了避免溶涨，一般将样品悬浮于等渗介质中。如用0.25M的等渗蔗糖液，蔗糖梯度的最小密度为0.3M或0.35—0.40M。分离大分子或核蛋白体亚基时，因颗粒不必悬浮于等渗介质中，梯度的最小密度可用0.15M。此时，由于粘度下降，分离时间大为缩短。

如果用盐介质进行平衡等密度离心，形成梯度的密度范围与梯度介质的性质、离心

力、梯度顶部和底部与转轴的距离及梯度液的起始密度有关。可用公式表示如下：

$$\rho_2 - \rho_1 = \frac{\omega^2}{2\beta^0} (r_2^2 - r_1^2) \quad (13)$$

由公式可见，离心力大，梯度的密度差也大。通常起始密度均应稍高于样品中颗粒的最大浮力密度（大于 0.01-0.02 克/厘米³），以避免梯度形成之前出现颗粒的沉淀，并让所有颗粒都能在平衡梯度中分成稳定区带，出现在梯度的较上部分。

3. 梯度(线性)的斜率 颗粒的沉降系数或浮力密度差较大，可选用较大的梯度斜率及较短的离心管，但这会导致颗粒区带变窄，降低区带容量（指稳定区带所容纳颗粒的最大量，它与区带宽度平方成正比，与斜率成反比）。梯度的斜率越大，区带越窄，靠得越近，回收区带时就易产生交叉污染；梯度的斜率小，虽然区带容量大，但由于粘度小，扩散严重，使区带宽度增加，并可能导致区带重叠而降低分辨率。超离心分离一般采用斜率较小的线性梯度，但需达到一定的梯度斜率，以阻止对流的影响，维持颗粒区带的稳定性。差速-区带离心所用梯度斜率一般比等密度离心小，但在高速离心并使用低样品浓度和相对宽的样品区带时，用斜率较大的线性梯度也能得到很好的分辨率。

平衡等密度离心的梯度斜率与转速、梯度底部与转轴的距离、介质性质或 β^0 值、浓度（成正比）、温度（成反比）、转子类型（角式大于外摆式）有关，可用公式表示如下：

$$\frac{d\rho}{dr} = \frac{\omega^2 r}{\beta^0} \quad (14)$$

由公式可知，低速斜率小，二个区带的中点离得远，但区带宽。梯度斜率随介质种类而不同，已知 $Cs_2SO_4 > CsCl > NaI$ ，与盐的 β^0 值相反。一般的分离最好用斜率稍大的盐梯度（太大也影响分辨率），斜率太小的梯度仅作纯化使用。

平衡等密度离心所产生的梯度斜率一般较小，如事先使用阶梯梯度或线性梯度，可使梯度斜率增加，但此梯度不稳定，离心时将重新分配为斜率小的梯度。

4. 梯度的容量 梯度容量取决于样品体积和浓度、梯度体积和斜率、所要求的分辨率、所用的回收方法和转子的效率等。已发现梯度的实际容量低于理论值，为后者的 90%。梯度的容量带有很大的经验性，如差速-区带离心为每毫升梯度体积 1—1000 微克，一般在 100 微克以下；外摆式转子的离心管（直径 2.5cm），每厘米直径所容许的样品量约为 0.15—0.8 毫升（随直径而变化）。梯度斜率相同时，角式转子的梯度容量比外摆式转子大，DNA 容量为后者的 10 倍左右。角式转子如用于分离二种 DNA（密度差 0.005 克/厘米³）时，梯度容量为 50—150 微克 DNA，如用于制备总 DNA，容量可大至 5 毫克。

五、制备超离心的操作^[6,8,9,14]

(一) 梯度的制备：

梯度可用机械法或手工操作法制备，也可用离心法形成。常见梯度的制备方法介绍如下：

1. 不连续密度梯度（或阶梯梯度）的制备 密度随管长或半径阶梯式增加的梯度为不连续梯度。其制备方法最为简单，通常先配好一系列不同密度的溶液，然后用移液管将梯度介质从浓到稀沿管壁小心加入，或用一加细管的注射器针头插到管底，从稀到浓一层层地铺到离心管中，即可产生一个不连续的密度梯度。这梯度不稳定，放置一段时间或

用金属丝轻轻搅拌，或轻敲离心管后，由于分子的扩散作用，就会慢慢变为连续的线性梯度。

2. 连续密度梯度的制备 密度随管长或半径逐渐增加的梯度为连续梯度。连续梯度又可分为：(1) 线性梯度；(2) 凹形或凸形梯度；(3) 复杂梯度。制备超离心常用线性梯度，其制备方法有三种：

(1) 阶梯梯度自动扩散法：由上述方法以相同体积和等差浓度制得阶梯梯度后，将梯度自然放置一段时间，即能形成所需的线性梯度。此法仅适用于低分子梯度介质(分子量 $\leq 1,000$)，每层梯度液以1—2厘米为宜。阶梯梯度应在无振动下自动扩散形成，形成时的温度最好与离心时的相同。扩散形成线性梯度所需的时间与梯度材料的分子量和扩散系数，梯度的温度、浓度和粘度，以及每层液的厚度、密度差等有关，通常需8—24小时以上。温度高，时间可略短。例如蔗糖梯度不易离心形成，制备5—50%蔗糖线性梯度时，是让50%、45%……5%浓度的蔗糖液及水各0.9毫升的阶梯梯度，在4℃下放置过夜(或室温下2—3小时)自动扩散而成。如用1毫米直径的细铁丝轻轻敲击，可大大缩短时间。多糖需数天才能扩散成线性梯度。

(2) 梯度产生器法：此法最通用。其装置又可分为手动式和自动式，实验室自制的简易梯度产生器即属前者。梯度产生器系由玻璃或有机玻璃等材料制成的大小相同的内外两室所组成，通常把外室称为储存室，内室称为混合室。小室高度与直径之比为2.5—3:1。二个圆柱形小室间有一连接管，管中间配备有作开关用的活塞或螺旋夹。混合室底部沿连接管的水平方向上还装有一塑料导液管，以螺旋夹控制梯度液流入离心管的速度。混合室中附有搅拌器，使用时一般控制转速为60 rpm左右。

现以蔗糖作梯度材料为例，制备5—30%的线性蔗糖梯度。先关闭两室的活塞，然后向外室和内室分别加入10毫升5%和30%的蔗糖液。装液时必须先装外室，在蔗糖液快满过连接管时轻轻打开中间活塞，使蔗糖液充满连接管到活塞间的通道后立即关闭活塞。手工操作中这是一个重要的步骤；不排除管内的空气，将会影响梯度的形状。内室充液时，可将导液管流出端提起，使之高出液体的水平面，以阻止液体流出。两室中的溶液应调节在同一水平面上，使两室连通时线性梯度不致为相互产生的对流所扰乱。两室都加完蔗糖液后，用固定支架将导液管紧贴离心管壁，使梯度液沿管壁流下，以避免扰乱梯度。开动电磁搅拌器，并打开两室连接管活塞。当梯度液自内室流出时，不允许再移动固定于支架上的离心管。混合时流速要慢，控制在1毫升/分左右。制备好梯度后，将离心管小心移到冷室中放置备用，梯度在几小时内是稳定的。也可把稀液加入内室，浓液加入外室，但此时梯度液导液管必须直插到离心管底，让浓溶液将稀溶液顶浮起来，最后仔细地将导液管取出。此法适用于疏水的、在管壁不形成水流的塑料离心管(如聚碳酸酯管和polyallomer管)，流速可相对大些，一般可达2毫升/分。

手动式梯度产生器虽简单，容易操作，但不能同时制备几个梯度。近年来，各种自动梯度产生器已相继出现，这些装置尽管在产生梯度的体积(几毫升，多至100毫升以上)或形状上各不相同，但都由一蠕动泵所操纵。例如日立公司55 P-2型超离心机的DGF-U型密度梯度产生器可同时制备6支梯度管，又能在离心后自动分层取出梯度中各区带。

改变内室或外室的横截面积也可得到某些特殊的非线性梯度。如图6-8所示，当A<B时为凸形梯度，A>B时为凹形梯度。

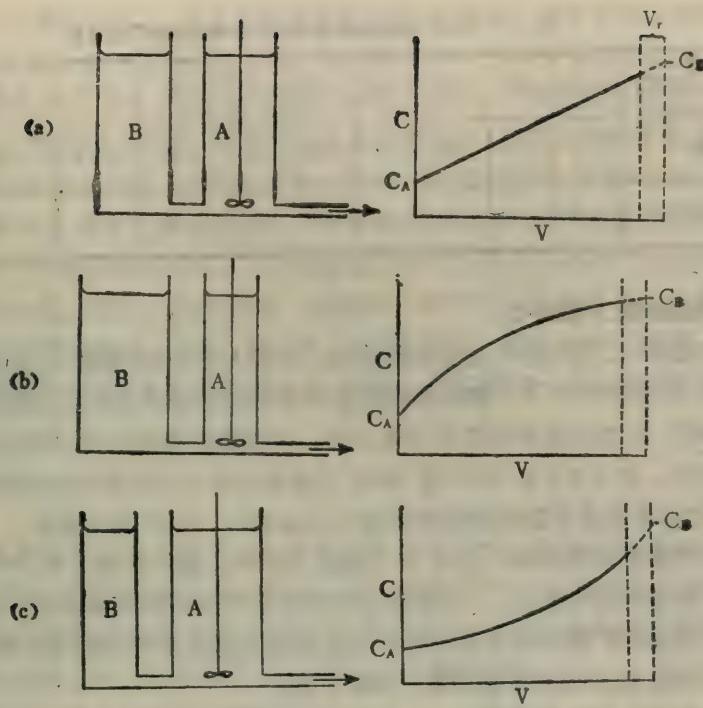


图 6-8 几种不同梯度形状的梯度产生器示意图

B 为外室(储存室),用浓溶液;A 为内室(混合室),用稀溶液。C_B、C_A、V_B、V_A 分别为回收梯度的浓度和体积, V_r 为残留体积

梯度产生器制备梯度虽有许多优点,但也有其不足之处。如: 小室中有残留液体,使梯度达不到最大密度; 机械搅拌增加内室压力,使梯度变形; 小室间连接管太小不易迅速建立平衡; 高粘液难以用泵控制恒定流速等。

(3) 平衡梯度法: 盐介质的线性梯度须用平衡法, 通过长时间高速离心均匀盐溶液和样品液(有时还含 Tris-HCl, 磷酸盐等缓冲液)达平衡而产生。盐介质离心足够长的时间, 当盐分子的沉降速度等于其反方向的扩散速度时, 即形成盐的平衡梯度。样品中的颗粒也由于受离心力影响而沉降或上浮到梯度内相应的等密度点上, 建立另一种平衡。将所需梯度的最大和最小密度液分成二层, 让盐分子静置扩散 12 小时, 然后进行离心, 可缩短平衡梯度形成的时间。外摆式转子离心形成的梯度线性比角式转子的好。

此法的关键是选择介质的起始密度, 并通过折射计进行准确校对。起始密度所需盐的重量(以 CsCl 为例), 可从表 6-9 求得。

也可用下面公式求出:

$$x(\%, \text{W/W}) = \frac{y}{1+y} = 137.48 - \frac{138.11}{\rho_{25}} \quad (15)$$

式中, y 为 1 毫升 DNA 样液中加入的 CsCl 克数, ρ²⁵ 为需要制备的 CsCl 密度(25°C)

此外, 有人介绍一种制备大体积蔗糖梯度的简单方法, 此法是将 20% 蔗糖液通过反复在 -20°C—-40°C 冰冻, 然后在 4°C 或室温融解(2—3 次), 可获得近似线性的 10—30% 蔗糖梯度^[13]。

表 6-9 CsCl 的起始密度与重量及最后体积间的关系

起始密度(克/厘米 ³)	1.66	1.67	1.68	1.69	1.70	1.71	1.72	1.73	1.74	1.75	1.76
重量(克)	1.17	1.19	1.22	1.24	1.26	1.29	1.31	1.33	1.35	1.36	1.37
最后体积(毫升)	1.30	1.30	1.31	1.31	1.32	1.32	1.33	1.34	1.34	1.34	1.35

(二) 样品的装入和离心:

样品在超离心之前,应作适当的预处理。许多大分子(或颗粒)在溶液中都带有电荷,离心沉降时,沉降快的分子可被沉降慢的带相反电荷的分子所吸引,减慢沉降的速度。分离这类样品前,应加入适量的低分子电介质,以排除沉降时电荷的相反影响。如在 10% 蛋白质溶液中,加入 0.2 M NaCl 或 KCl 可使静电吸力对沉降速度的影响减少到 1% 以下。样品中如有容易沉淀的凝聚物或其它不溶物时,也应预先滤除。还要注意样品的稳定性,有时须加入缓冲剂、稳定剂(硫醇、EDTA、酶的底物, Mg^{++})等。样品液的密度应小于梯度的最小密度。必要时也可将样品用介质做成倒梯度,使高分子样品的颗粒向梯度方向的扩散与高浓度小分子梯度介质向低浓度样品带的扩散速度相等,以减少因离心前颗粒局部沉降所造成的分辨率下降。

样品在梯度中所处位置有四种,即顶部、底部、中间及混合。一般样品是以薄层铺放在梯度顶上。样品的用量对分辨率有很大影响。当颗粒沉降系数或浮力密度差较小时,常采用窄样品带(梯度总体积的 5% 以下)。样品浓度不要太高(为梯度介质最低浓度的 10%)。操作时用吸管吸取,然后沿管壁小心放入。吸管的尖端绝不允许接触梯度的液面,一般要离开 0.5 毫米,紧贴管壁,避免自由滴落。离心管最好事先放入转子内,以免管子装入时扰乱梯度和样品层。外摆式转子加样后的液面与管口相距 2—3 毫米。如果用角式转子离心,最好将管子部分充满,以防止梯度重新定向时,管帽分裂梯度,还可避免梯度介质对金属管帽的腐蚀。盛放溶液的多少与管子角度、材料强度、厚薄有关,一般装量约为 1/3—1/2。塑料离心管要加满,一般梯度介质及样品加完后须用密度小于水的、与水不相溶的惰性液体——矿物油(如轻石蜡油)填满(差速离心可全用样品液充满)。有时样品也可通过一根长金属导管导入管底。此法对分离密度较小的颗粒特别有用,已用于分离细胞、核蛋白等。使用时须注意不能让气泡进入梯度,样品密度需用固体介质调到大于梯度底部的密度。

样品装好后,将离心管盖拧紧,小心放入松紧恰当的离心管腔内,按照事先设计的离心条件及转子、离心机的使用说明书进行超离心操作。因为生物颗粒均不稳定,离心一般均在低温下进行,管子、梯度液、转子也最好预冷至一定温度后再装入样品。但低温会增加梯度的粘度,使离心时间延长,不利颗粒的分离。开始离心时应缓缓加速,离心达所需时间后,须让转子自由地慢慢停下(不许制动!)。尤其在 5,000 rpm 的低速下,速度的剧变很容易扰乱梯度液和样品层或梯度中颗粒区带,当用粘度小的梯度如 (CsCl) 及直径大的管子时,这种扰乱更为严重。进行平衡等密度离心时,转速不能过高,以免盐梯度的平均密度超过 1.2,管底盐浓度过高而出现结晶。高密度的盐结晶(如 CsCl 结晶可达 4 克/厘米³)受很大的离心应力作用,此应力超出了转子的设计限度,会造成事故。

区带转子的离心操作不同。以动态装放料区带转子为例。梯度液是在转速约 3,000 rpm 的低速下泵入。首先泵入的是低密度液，通过导管分布于转子的四周。由于离心力的作用，在转子内壁成均匀的一层。随着梯度液的不断加入，较浓梯度液将把较稀液不断推向转子的中心。梯度液加完后，再用一种最浓的液体作“垫层”，将转子整个密闭空间充满，以防止颗粒在转子壁积累。然后通过转子的中心导管缓慢地（5 毫升/分）加入样品（样品层一般为 10—200 毫升），最后再加入一种更低密度的液体作“覆盖层”，同时有等体积的“垫层”从转子四周被取代出来。上述梯度液及样品加完后移去转子上的加液装置，将转子加速到预定速度，经过一定时间后，就能得一系列分级分离区带。然后转子减速到 3,000 rpm，以回收颗粒区带。此时，通过进一步把“垫层”液加到转子周围，可逐渐置换出密度较小一端的梯度液，并进行分部收集、测定。用区带转子可大量制备样品，一次可高达 100 毫克以上。

（三）取出梯度：

从离心机提出转子和从转子取出离心管并进行回收梯度区带的操作时，应十分小心，避免管子震动。操作的温度最好与离心时的一致，以防温度变化引起的热对流扰乱区带。否则的话，最好的分离也往往由于回收方法的不当或回收操作的错误而招致失败。在处理粘度小或斜率小的梯度时，更应特别小心，以免使分辨率降低。

梯度区带的分部回收有如下三种方法：

1. 底部收集法（穿刺法） 这是一种简易的手工操作法。采用针穿刺离心管底部，使梯度靠重力自由滴出，然后依次作分部收集（如图 6-9A）。此法适用于薄壁塑料管，操作时先将管固定在支架上，然后用一根针将管底刺穿，使梯度液从小孔滴出。也可事先在管底贴一块胶布，防止穿刺后液体的渗漏，后用 22 号注射针头（锯去针尾）小心地经胶布刺入管底，让液体缓慢沿针头滴下。流出液分部收集于小试管中，经分析后决定取舍或合并。液滴的大小（或流速）可通过将梯度管塞上橡皮塞，塞子上插入一根连着橡皮管和螺旋夹的玻管，或通过与一测压计连接，维持恒定的压力来控制。也可将离心管与一储液容器连接，以油或稀溶液补偿滴下的液体，保持流速不变。流速一般控制在 0.5—1 毫升/分，特别是粘度较大的梯度，缓慢的流速可减少区带沿管壁的拖尾现象。

此法对梯度扰动小，但离心管不能再用，而且不适合回收管底有沉淀或粘度大的梯度（易导入空气），也不适于不锈钢管或厚壁塑料管。

2. 顶部收集法 顶部收集法又可分为取代法和虹吸法。

（1）取代法：是回收梯度中最常使用的一种方法，分为向上及向下取代二种。向上取代可用人工操作，方法是通过由针头穿刺管底或由插入管底的细管注入浓梯度液，将梯度液从稀到浓经顶盖另一出口管排出。如用一贮液器代替注射器进行穿刺取代，控制流速的效果会更好。使用梯度回收仪时，从管顶盖将一根细导管小心插至管底，然后用蠕动泵由导管注入高浓液体（其密度比梯度大），迫使梯度中的分离区带依次从盖上另一出口管流出，以小试管分部收集（图 6-9B）。操作时应先排除导管内的空气。用作取代液的溶质应是惰性的，溶度要足够大，能形成高浓溶液。常用的取代液有蔗糖、盐以及某些与水不相混合的浓溶液，如四溴甲烷（密度可达 2.96 克/厘米³）等。取代液如是水溶液，则最好与梯度介质组分相同，以免产生扩散混合现象。

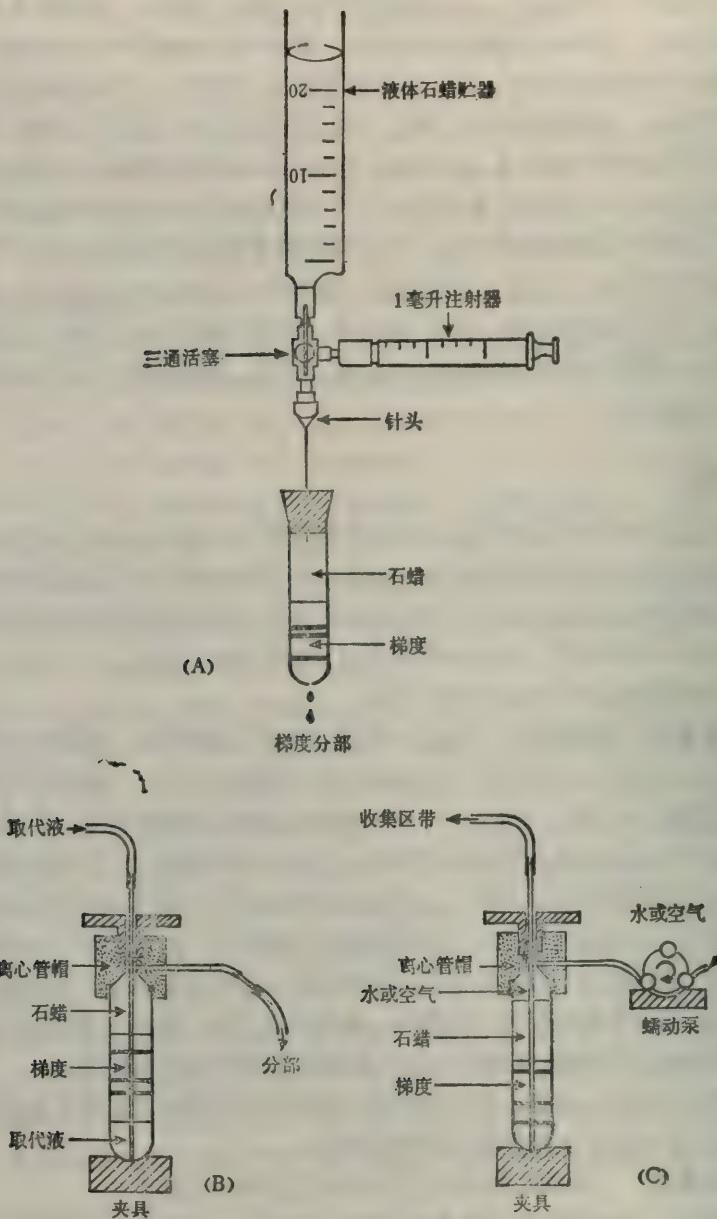


图 6-9 回收梯度的方法
 (A) 底部穿刺收集法 (B) 向上取代法 (C) 向下取代法

向梯度顶部充入空气或轻液体(水)，也可从插入底部的导管由浓到稀地从顶盖取代出梯度液。这种取代法称为向下取代法(图 6-9C)但效果较差，较少使用。

除穿刺取代法以外，其它取代方法多用于不锈钢管和厚壁管，使用取代法时流速应缓慢，以免管壁滞留液体而造成梯度混合。这种混合现象可通过使用疏水的窄、短梯度管而减少。取代前梯度顶部如有悬浮不溶物，须事先除去。流出管应尽可能短，以减少管内混合，导致分辨率下降。此法优点是不破坏离心管，管子能反复使用，能用于较粘梯度，是

回收梯度最好的一种方法。缺点是开始取代操作时易引起扰乱，操作需要特别小心，而且不适合粘度更大的梯度。取代法可借光学(或放射性)系统进行流出液跟踪，简化分析化验工作。

(2) 虹吸法：此法是用一根聚乙烯小管插到管底部，用虹吸法吸出梯度。它也不损伤离心管，尤其适用于不锈钢管中物质的分级分离。但虹吸时易引起分离区带扰乱，最好使用专门的装置。例如 DGF-U 型密度梯度自动产生器，就是一部用蠕动泵逆向运转而以虹吸收集梯度区带的分部收集器。

除以上取代法和虹吸法外，有时从管上部直接仔细地用注射器或吸管定量移出梯度液，也可收到较好的效果。如果已知某颗粒区带的位置，也可用注射针头刺入管壁抽取，但效果差。

(3) 切割法：极粘的梯度宜用切割法。所谓切割法就是用离心管切割器将冻结的塑料管子切成薄片的一种方法。此法仅适用于赛璐珞管或硝酸纤维素管。操作时把离心管插在操纵台的孔中，后用一锐利的切刀切割管子。切下的部分留在刀刃上，然后用注射器或吸管吸取这部分梯度液，如此即能逐一将梯度分部收集。操作中应注意夹紧各可动部分，减少切口周围的渗漏现象。

切割器的型号很多，如日立公司 55 P-2 型超离心机的 TSU-2 型离心管切割器。较新的切割法是在梯度中加入丙烯酰胺、核黄素和交联剂，离心后将梯度曝光聚合，然后再进行切片操作^[18]。

(四) 梯度的分析

在制备梯度和样品液或需了解离心后颗粒区带在梯度中的位置时，应进行密度测定。测定密度的最简单方法是用折射计，此法迅速，用量少，如阿贝折射计仅需样品 25 微升左右。由于折射率与密度有正比的关系，通过折射率即能换算出被测梯度液的密度(如表 6-10)。但折射率与温度等因素有关，须考虑这些因素的影响。梯度的密度也可用比重瓶直接测定，但样品用量较大，通常需 0.1—0.3 毫升。

梯度通过适当方法分部收集后，应进行分析化验，以便分类合并或作后处理。分析梯度中的回收物质常用紫外吸收法、酶活力测定法、放射标记法等。蛋白质，核酸或某些含蛋白质、核酸占优势的细胞器，病毒等可用紫外吸收法测定。细胞器一般可测定标志酶活性，通常每一组分至少选二种标志酶。如一时找不到更好的测定目的物，也可测光吸收来推断分部的组分。对于同位素标记物，最好是测定其放射活性。此外，某些情况下也可用免疫法、电泳法或在 500—600 nm 下用光散射法测定物质在梯度中的分布。亚细胞成分可用电镜或光学显微镜(如相差显微镜)观察分析各分部的组分和分布。最后根据分析结果绘图。

梯度介质对梯度分析的影响很大。如糖介质(尤其蔗糖)、metrizamide 能抑制酶活，测定时每次介质浓度应一致。有时适当的稀释也能有效地解除这种影响。又如碘化物、三碘苯衍生物、Ludox 等有强烈紫外吸收，能干扰核酸、蛋白质紫外测定。三碘苯衍生物，蔗糖等也干扰放射活性测定。

凡对分析有干扰的梯度介质，均应设法避免。如单双糖、多糖或 metrizamide 都干扰核酸、蛋白质和糖原的分析。单双糖、metrizamide 可透析或超滤除去，或用酸、乙醇使核

表 6-10 各种梯度介质的折射率 η 与密度 ρ 的换算公式

介 质	公 式
蔗糖	$\rho_0^\circ = 2.7329\eta_{20^\circ} - 2.6425$
Ficoll. 葡聚糖	$\rho_{20^\circ} = 2.381\eta_{20^\circ} - 2.175$
牛血清白蛋白	$\rho = 1.4129\eta_{24^\circ} - 0.8814$
Metrizamide	$\rho_{20^\circ} = 3.350\eta_{20^\circ} - 3.462, \rho_0^\circ = 3.453\eta_{20^\circ} - 3.601$
Ludox	$\rho = 8.204\eta - 9.936$
CsCl	$\rho_{20^\circ} = 9.9688\eta_{20^\circ} - 12.292$ (适用于密度 1.00—1.29, 折射率 1.333—1.360) $\rho_{20^\circ} = 10.9276\eta_{20^\circ} - 13.593$ (适用于密度 1.22—1.90, 折射率 1.355—1.418) $\rho_{25^\circ} = 10.2402\eta_{25^\circ} - 12.6483$ (适用于密度 1.00—1.38, 折射率 1.333—1.370) $\rho_{25^\circ} = 10.8601\eta_{25^\circ} - 13.4974$ (适用于密度 1.25—1.90, 折射率 1.357—1.418)
Cs ₂ SO ₄	$\rho_{20^\circ} = 12.120\eta_{20^\circ} - 15.1662$ (适用于密度 1.10—1.40, 折射率 1.342—1.366) $\rho_{25^\circ} = 13.6986\eta_{25^\circ} - 17.3233$ (适用于密度 1.40—1.80, 折射率 1.366—1.396)

注: (1) 水在 20℃ 的折射率为 1.3330。 (2) 上述公式仅适用蒸馏水配制的介质, 未考虑其它成分。如介质中还包含缓冲剂、其它盐、EDTA 等成分, 应作折射率修正。

酸、蛋白质沉淀而分开;多糖则用稀释或离心解除。被测物质的浓度也影响分析准确度, 紫外分析蛋白质浓度应为 0.2—3%, 核酸浓度最低限度为 0.004%。

进行梯度分部的分析时, 对颗粒的分布必须心中有数, 才能有目的地选择测定方法。

(五) 操作注意事项

超速离心机是生化制备和生化研究的重要精密设备, 又因其转速高, 产生的离心力大, 使用不当或缺乏定期的检修保养, 都可能发生事故。

离心机故障大多由转子的不平衡引起。离心管的称量误差; 长期使用造成转子表面的腐蚀、损伤; 离心管放错位置; 管子重力中心的不平衡(重量相同的梯度管和非梯度管不能一起离心); 塑料离心管的变形、破裂等是引起转子失衡的主要因素。失衡的严重后果是导致驱动杆弯曲, 甚至使转子抛离转轴。在离心过程中, 转子必须垂直放下或提起, 避免碰撞转轴, 一旦发生转轴弯曲或断裂, 应更换后才能使用。

为了保障使用安全, 初学者除严格按照说明书规定的程序使用外, 还要熟悉和掌握所用离心机和转子的性能, 以及维修保养事项。遇有疑问, 或操作中发生故障时, 应请专人处理。转子、离心管用后须用温水或中性去污剂清洗、干燥后保存。塑料管最好在低温避光处保存。区带转子必须拆下各部件, 依次用自来水、蒸馏水(有时还用 70% 乙醇)洗涤, 除去痕量残存的梯度液, 以防结晶堵塞液管。铝转子应定期上蜡, 防止水分进入裂缝。

六、制备超离心实例

(一) 用 CsCl 平衡等密度离心法制备质粒 DNA^[4]

此法是利用添加溴化乙锭影响线形 DNA、双螺旋环状 DNA、或超螺旋环状 DNA 等的浮力密度而达分离。

(1) 在大肠杆菌培养液 1.6 升 (E650 约 0.6) 中加入约 0.2% (V/V) 的氯仿, 摆动 10

分钟以杀死菌体，然后除去不溶氯仿。

(2) 在 4°C、8,000g 下，离心 15 分钟收集菌体。然后悬浮在 1.200 毫升 pH 8.0 的 50 mM Tris-HCl 中，再在 4°C 8,000 g 下离心 15 分钟，收集沉降细胞。

(3) 将大肠杆菌细胞沉积物悬浮在 4°C 的 130 毫升含 25% (W/W) 蔗糖的 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中，并加入 13 毫升溶菌酶溶液 (10 毫克/毫升，溶于 pH 8.0 的 50 mM Tris-HCl 中)，5 分钟后，再加入 26 毫升 0.5 M EDTA (pH 8.2)，混匀后 30°C 保温 15 分钟。

(4) 加入 120 毫升 3.6% (V/V) 的 Triton X-100，使最后浓度为 1.5% (V/V)，并在 20°C 保温 10 分钟，使原生质体胞溶。

(5) 混合液于 4°C、65,000g 下离心 1 小时。

(6) 倾析除去上清液，在约 200 毫升残留物中加入其体积 1/9 的 5 M NaCl 和最终浓度达 10% (W/V) 的聚乙二醇 (分子量 6,000)。

(7) 混合液在 20°C 下搅拌，使聚乙二醇溶解，然后在 4°C 下放置过夜。

(8) 于 4°C、8,000 g 下离心 15 分钟，再将沉淀溶于 10.8 毫升 0.1×SSC (15 mM NaCl, 1.5 mM 柠檬酸钠, pH 7.0) 中，然后再加入 11.7 克 CsCl 和 1.2 毫升溴化乙锭液 (2 毫克/毫升)。

(9) 剧烈搅拌使 CsCl 溶解，再用水或 CsCl 将溶液的折射率调到 1.3880—1.3890。

(10) 在 MSE 10 × 10 钛角式转子的二个聚碳酸酯管中各加入 7.5 毫升上述液，然后用石蜡油将管子加满。20°C、40,000 rpm 下离心 64 小时。

(11) 用顶部收集法回收质粒 DNA 的区带。

(12) 用 CsCl 所饱和的异戊醇或异丙醇反复抽提，或将收集的梯度液通过 Dowex 50 树脂而除去有机杂质。然后在 4°C 下对 0.1×SSC 透析 3 天，可得基本没有非质粒 DNA 的活性超螺旋质粒 DNA。

此法所得的质粒 DNA 较多，每管可达 500 微克。

(二) 用 RbCl 梯度纯化多瘤病毒^[17]

(1) 用小白鼠胚细胞在培养基 (Eagle 氏培养基加 10% 牛血清) 中，以少于或等于 1 转/分的旋转速度进行摇瓶培养，使细胞生长汇合。每瓶含汇合细胞约 10^8 ，需 100—200 毫升培养基。

(2) 培养物用多瘤病毒毒株以 1 pfu/细胞进行侵染，在 37°C 下保温一周后收获。

(3) 将每瓶细胞和培养基转入离心管，加 5% 体积的 0.4 M 磷酸缓冲液 (pH 5.6)，并冷却到 4°C。低 pH 和低温可保证大多数病毒吸附到细胞上，培养基中仅留下极少病毒 (10^2 HAU/毫升或更低)。2,000 g 下低速离心 15 分钟，弃去上清液。

(4) 以每 10^8 个细胞重悬浮于 2.5 毫升 Tris 盐水中，4°C 下存放，并检查有无细菌污染。若无污染则将样品 4 份合并转入烧瓶 (每瓶 4×10^8 个细胞，10 毫升 Tris 盐水) 中冻、融三次。

(5) 每 10 毫升悬浮液中加入 2.5 毫升霍乱弧菌的受体破坏酶 (RDE)，37°C 保温 24 小时以破坏受体。悬浮液经 RDE 处理后加入 5% 体积的 1 M NaHCO₃ 使呈碱性，加热至 37°C。2,000 g 下离心 15 分钟以除去细胞碎片，然后用 10 毫升热 Tris 盐水洗涤沉淀，并

悬浮于 10 毫升 Tris 盐水中。此步处理须从各分部取样 0.1 毫升，用磷酸缓冲的盐水稀释 100—10,000 倍，37℃ 保温 30 分钟，再用血球凝集测定法估算解离出的病毒。经一次 RDE 提取后，如仍有 10—20% 以上病毒留在细胞碎片上，应重复处理，或增加 RDE 用量（但应避免过量 RDE 进入病毒液）。

(6) 将较稀的病毒悬浮液在 80,000 g 下离心 2 小时，使病毒浓缩，并重悬在少量 Tris 盐水中。

(7) 5 克 RbCl 溶于 7.6 毫升 0.05 M Tris 缓冲液 (pH 8.0) 中，以每管 3 毫升量分装三个塑料离心管。每管加入 1 毫升病毒悬浮液并搅拌到上半个梯度。在 10±5℃ 下，30,000 rpm 离心 24 小时。用穿刺法分部收集。

(三) 用 CsCl 等密度离心提纯染色质蛋白质^[4]

(1) 将染色质在缓冲液(含 5M 脲、1mM 二硫赤藓糖醇、0.1 mM EDTA 和 2M NaCl 的 10 mM、pH7.5 Tris—HCl) 中匀化，然后在 12,000 g 下离心 10 分钟。倾出上清液，沉淀在同一缓冲液中再匀化，使染色质在高离子强度的盐介质中充分解离为核酸和蛋白质组分，再在 12,000 g 下离心 10 分钟。合并二次上清液，用蒸馏水稀释染色质的蛋白质至浓度为 1 毫克/毫升（或更少），然后加入等体积的含 0.1 mM 苯甲基碘酰氟的 55% (W/W) CsCl 溶液 (5.5 M)，混匀。

(2) 在 MSE 10 × 10 钨角式转子的离心管中放入 5 毫升上述混合液，再用液体石蜡装满，并在 4℃，50,000 rpm 下离心 68 小时。

(3) 离心后用向上取代法取出梯度，5 毫升梯度的上面 1.5 毫升部分均含蛋白质，可分部收集。

(4) 通过透析或凝胶过滤脱盐，得纯染色质蛋白质。

(四) 用 NaBr 等密度离心分离血浆脂蛋白^[4]

(1) 用稀 NaBr 液 (11.4 克 NaCl 和 0.1 克 EDTA，以蒸馏水定容至 1 升，pH 7.8) 和浓 NaBr 液 (263 克 NaBr、11.4 克 NaCl 和 0.1 克 EDTA，以蒸馏水定容至 1 升，调 pH 7.8) 通过梯度产生器，在 MSE 3 × 25 外摆式转子的离心管中制备 20 毫升密度为 1.003—1.2 克/厘米³ 的 NaBr 线性梯度。

(2) 每毫升血清样品中加入 0.32 克 NaBr，将密度调到 1.22 克/厘米³。

(3) 将 0.5—1 毫升样品分层到梯度的底部，样品层下面再铺放 1.5—2.0 毫升浓 NaBr 液 (0.582 克/毫升)。导入样品层应注意排除气泡，以免扰乱梯度。

(4) 在 4℃，30,000 rpm 下离心 2 小时。从静止到 5,000 rpm 要上得慢，一般达 1,000 rpm 应为 3 分钟左右，1,000—5,000 rpm 为 2 分钟，后按正常加速。

(5) 离心后通过向上取代法取出梯度。通常最低密度脂蛋白在梯度顶部，较低密度脂蛋白在顶部以下 10—15 毫升之间；而高密度脂蛋白与其它血清蛋白一起在原样品位置。

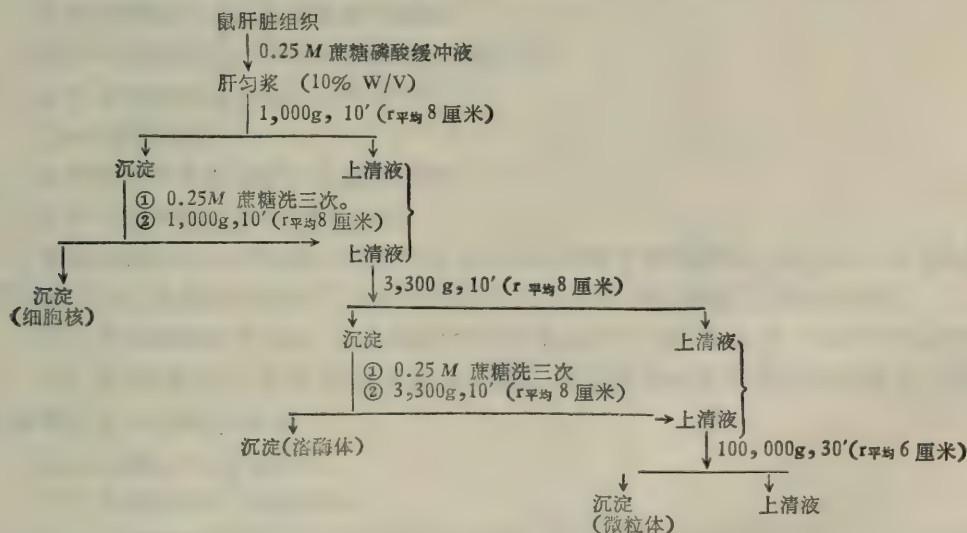
(五) 用线性或阶梯蔗糖梯度制备线粒体^[7]

(1) 500 克蓖麻籽，在室温下用水浸泡过夜，浸泡过的蓖麻籽在 30℃，湿润条件下萌

发 5 天。

- (2) 除去萌芽蓖麻籽的胚芽和子叶, 将胚乳组织用蒸馏水洗涤后置冰中冷却。
- (3) 制备 500 毫升由下列成分组成的混合液(研磨介质): 0.4M 蔗糖, 0.165 M pH 7.5 麦黄酮 (tricine) 缓冲液, 0.01 M KCl, 0.01 M MgCl₂, pH 7.5 0.01 M EDTA, 0.01M 二硫苏糖醇。
- (4) 在 60 克胚乳组织中加入 90 毫升上述混合液, 并用捣碎机捣碎 6 分钟。
- (5) 将粗糊状物在冰浴中研磨成细糊。
- (6) 用棉布粗滤, 滤液在 270g 下离心 10 分钟, 除去细胞和大细胞碎片。上清液倾入冷却离心管, 10,800 g 下离心 30 分钟。所得细胞器沉淀物再悬浮于 4—6 毫升研磨介质中。
- (7) 用 pH 7.5、0.01 M EDTA 溶解适量蔗糖, 配成 60、57、50、44 和 33% 的蔗糖液, 然后按顺序加入以建立蔗糖阶梯梯度。也可先加 16 毫升 60% 蔗糖液, 然后仔细地在上面建立 33—60% 的蔗糖线性梯度。
- (8) 在梯度上仔细地铺入 1—2 毫升细胞器悬浮液的样品层。
- (9) 用 SW 25.2 外摆式转子于 23,000 rpm 下离心 5 小时。
- (10) 离心后用底部收集法回收分离线粒体。测定各分部柠檬酸合成酶和苹果酸脱氢酶活性。

(六) 用差速离心法分离大白鼠肝脏中各种亚细胞成分^[6]



参 考 文 献

- 【1】微生物工程编写组编: 微生物工程(下册), 上海科技出版社, 第32页(1982)
- 【2】[苏] A. H. 普兰诺夫斯基等著, 化工部中等专业学校教师合译: 化工过程及设备(上册), 化学工业出版社, 第212页(1960)
- 【3】上海化工学院等编: 化学工程(第一册), 化学工业出版社, 第178页(1980)
- 【4】Birnie, G. D. and Rickwood, D., Centrifugal Separations in Molecular and Cell Biology, Butterworths Group Pub., London (1978)

- [5] Hinton, R. and Dobrota, M. Density Gradient Centrifugation, Amsterdam, North-Holland Pub. (1976)
- [6] [英]B. L. 威廉斯等著,王海云、冯北元译:实用生物化学原理和技术,科学出版社,第29页(1979)
- [7] Cooper, T. G., The Tools of Biochemistry, John Wiley and Sons (1977)
- [8] Morris, J. O. R. and Morris, P., Separation Methods in Biochemistry, Second edition, London, Pitman (1976)
- [9] 中山大学生物系生化微生物教研室编:生化技术导论,人民教育出版社,第353页(1978)
- [10] 程伊洪、王克勤:超速离心分析法,仪器分析及其在分子生物学中的应用(第三册),刘培楠等编,科学出版社(1978)
- [11] 余兴明编:离心技术——生化实验技术讲座之(一),中国生物化学会(1983)
- [12] Parish, J. H., Principles and practice of experiments with nucleic acids, Longman Group Limited, pp. 106 (1972)
- [13] Baxter-Gabbard, K. L., FEBS Lett., 20, 117(1972)
- [14] [西德] p. 康德拉等著,中国医学科学院肿瘤防治研究所细胞生物室译:分子生物学方法,科学出版社,第190页(1977)
- [15] Jakoby, W. B. Enzyme purification and related techniques. in "Methods in Enzymology", Vol. 22, Academic Press, New York and London, pp. 168 (1971)
- [16] Birnie, G. D., Subcellular Components, Preparation and Fractionation., Second Edition, Butterworths and University Park Press, London and Baltimore (1972)
- [17] [英]K. 哈伯尔,N. P. 萨尔兹曼著:病毒学基本技术,科学出版社(1976)
- [18] Jolley, W. B., et al., Analyt. Biochem., 21, 454(1967)
- [19] Grossman, L. and Moldave, K., Nucleic acid, part B. in "Methods in Enzymology", Vol. 12 (1968)
- [20] Catsimpoolas, N., Methods of Cell Separation, Vol. 1 (1977)

第七章 过滤与膜分离技术

苏拔贤 卓肇文

第一节 过 滤^[1-4]

过滤是利用多孔介质阻留固体而让液体通过，使固体和液体分离的方法。在生化制备中，从原材料处理到产品的提取分离精制都可能涉及到过滤。过滤的目的一是除去不溶性杂质得到所需的清液以便进一步提纯，二是收集固体中间产物或结晶成品。

一、过 滤 速 度

一般以单位时间内单位过滤面积流出的滤液体积计算。常用下式表示

$$U = \frac{n\pi d^4 \Delta P_0}{128\mu L}$$

U = 过滤速度；

n = 过滤面积上的滤饼毛细孔道数；

ΔP₀ = 毛细管孔道两端的压强降(千克/米²)

μ = 滤液的粘度(千克·秒/米²)

L = 滤饼厚度(米)；

α = 毛细管孔道弯曲程度校正系数；

d = 毛细管孔道直径(米)

实际上滤饼毛细管孔道的情况很复杂，n、α、d 难于准确测定。故上式只能反映各因子的相互关系及各因子所起作用的综合结果。从上式可知，影响滤速的因素有：

- (1) 液体的粘滞度越大，滤速越慢；粘滞度随温度升高而降低，故升温可增加滤速。
- (2) 滤材(如滤纸、滤布、玻璃纤维、石棉板，多孔陶质滤板等)的毛细管愈长，管径愈小或数目愈少，则滤速愈慢。
- (3) 压差愈大，滤速愈快。
- (4) 滤渣层越厚，滤速越慢。
- (5) 沉淀中有胶状物或其它可压缩的物质(如细菌或发酵液中的悬浮物等)，均易堵塞滤孔，使滤速大大减慢。

二、提高滤速的主要措施

选择适当的过滤介质，添加助滤剂，增加过滤推动力及加大过滤面积等，均可增加滤速，现分述如下：

(一) 选择适当的过滤介质

1. 选择过滤介质应考虑的因素

- (1) 孔径大小适于截留被分离的固体微粒，孔径过大，则滤液不清，太小则滤速过慢。
- (2) 孔的数量多，孔道短且不很弯曲，则滤速快，否则滤速慢。
- (3) 耐酸碱，化学稳定性好。
- (4) 有一定机械强度，易于回收。
- (5) 工业上要求再生方便，使用寿命长，成本低。

2. 过滤介质简介

(1) 通常棉、麻、丝织品适用于沉淀颗粒较粗或较粘稠的中性、弱酸性或弱碱性物料，但不耐强酸强碱。

(2) 实验室中最常用的是滤纸。滤纸分工业用和分析用两类。按其材质和滤速的差别又分慢速、中速和快速三种。一般滤纸不耐强酸、强碱。近来国外滤纸的型号规格很多，分别适于过滤各种物质。离子交换滤纸在过滤时还兼有分离作用。日本 TOYO 出品的离子交换滤纸有 DEAE, ECTEOLA 阴离子交换滤纸和 CM 阳离子交换滤纸。此外还有供特殊试验用的活性炭滤纸、采血用的滤纸、玻璃纤维滤纸等。过滤时滤纸折叠形状对滤速有影响，有平折法与多折法，见图 7-1。多折法滤速一般比平折法高。

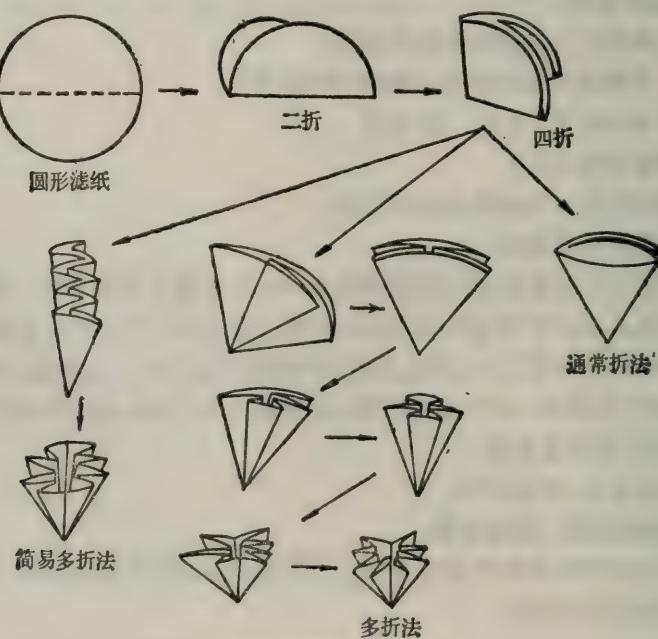


图 7-1 滤纸的各种折叠方法

- (3) 过滤介质还有玻璃纤维、垂熔玻璃、石棉或烧瓷滤板，涤纶等。

玻璃纤维或垂熔玻璃滤器可耐强酸，但不耐强碱。石棉或烧瓷滤板，涤纶等可耐强酸、强碱。食品、医药及发酵工业中因过滤面积大，并考虑到成本、再生及耐用等因素，多用涤纶、卡普纶、尼龙 66、维尼纶等作过滤介质。它们不仅抗酸碱，耐用，而且不沾料，易

再生。涤纶有多种规格，其粗密孔径各不相同，可根据需要选用。

(二) 加助滤剂

过滤时滤饼的形成对滤速影响很大，如组成滤饼的颗粒很小而粘度较大，则增加压力不但不能增加滤速，而且滤饼中毛细孔变形缩小还会使滤速减慢。这时需加助滤剂，以增加滤饼疏松度，防止堵塞过滤介质的孔道。常用助滤剂有硅藻土，活性炭，纸粕，细砂等。加助滤剂的方法是在过滤前把助滤剂先均匀铺在过滤介质表面，或与滤液混合一起过滤，滤毕再回收助滤剂。最好选用易与样品分离的助滤剂。

(三) 增加过滤推动力

通常推动力愈大，滤速愈快。根据产生过滤推动力的条件不同，分为常压、加压和减压过滤三种。

1. 常压过滤 主要由滤液位差产生推动力引起过滤。因此滤速慢，操作时间长，很少用于分离大量样品或不稳定物质。工业上的吊滤及实验室中常规过滤属于此类，简单装置如图 7-2 及图 7-3(a)。此法补充加样时间难掌握，如改为连续过滤，则较方便，简单装置如图 7-3(b)。

2. 加压过滤 用压缩气体加大液体所受的压力或用泵把样液输送至过滤装置时产生液压作为过滤的推动力。加压过滤时压力愈大，滤速愈快，直至滤饼的厚度和粘结度增加至一定限度时增压才失去作用。加压过滤适用于粘度较大，沉淀颗粒较细的溶液。如工业用的板框过滤机，加压叶片过滤机属于此类。实验室常用加压过滤装置如图 7-4。它的特点是装样漏斗或过滤器需用坚固材料（如金属）制成且密封。并注意在用前做好安全检查。

3. 减压过滤 和加压过滤相反，是在过滤介质下方抽真空，以增加过滤介质上下的压差，推动溶剂通过过滤介质。实验室常用的和特殊的减压装置如图 7-5 及 7-6。工业

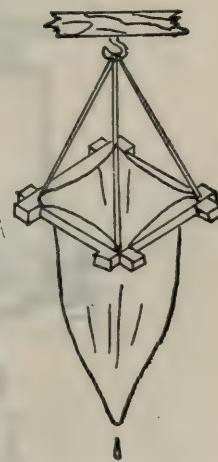


图 7-2 吊滤

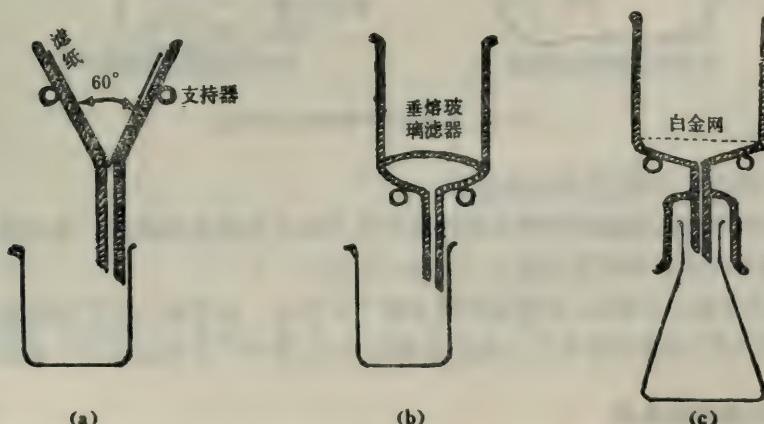


图 7-3(a) 实验室几种常压过滤装置

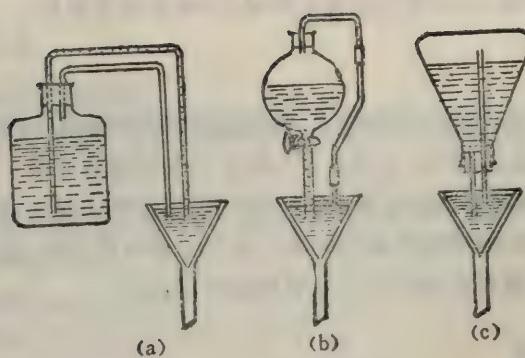


图 7-3(b) 连续过滤的仪器

—具虹吸瓶的装置； b—具分液漏斗的装置； c—具倒置锥形烧瓶的装置

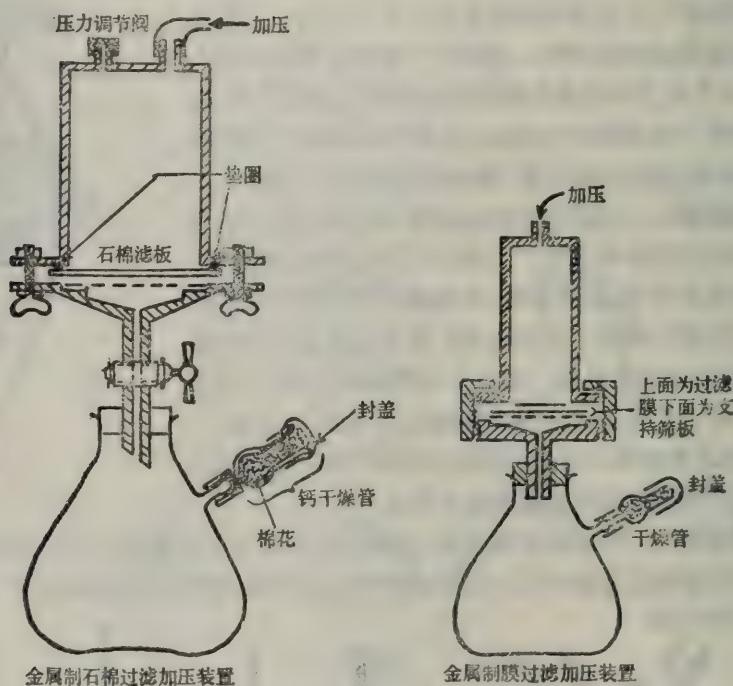


图 7-4 实验室中常用加压过滤装置

装置有陶瓷抽滤缸，转鼓真空过滤机等。

加压过滤与减压过滤的共同点是过滤介质下面必须有支持滤板，或过滤介质。都是一些强度较大的烧瓷滤板等物质。

此外，还有离心过滤法，实验室装置如图 7-7 所示。利用离心机产生的离心力促使滤液通过过滤介质，分离效果更好。但过滤液体积小，多用于分离临床的小量组织样品。

(四) 提高过滤时的温度

升温使溶液粘度减少，溶质溶解度增大，对提高滤速显然有利。但此法不适用于热敏

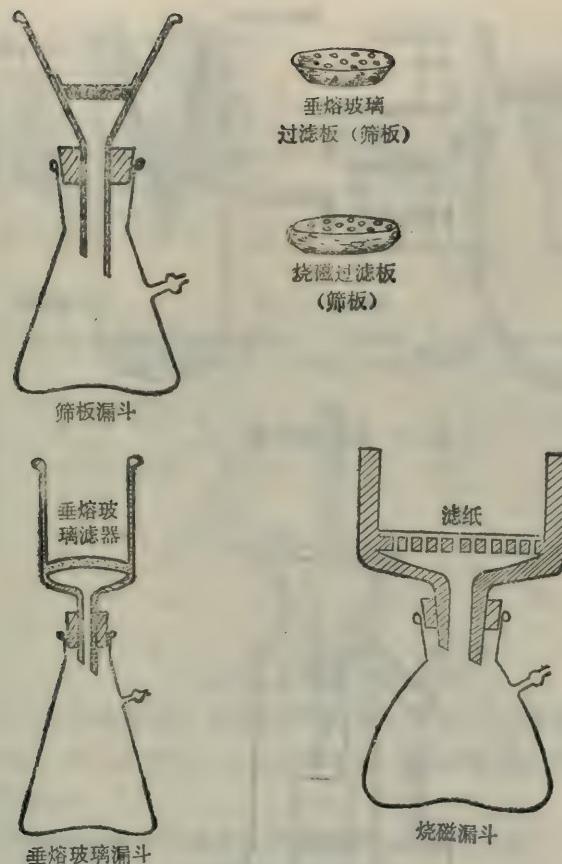


图 7-5 实验室中常用的减压过滤装置

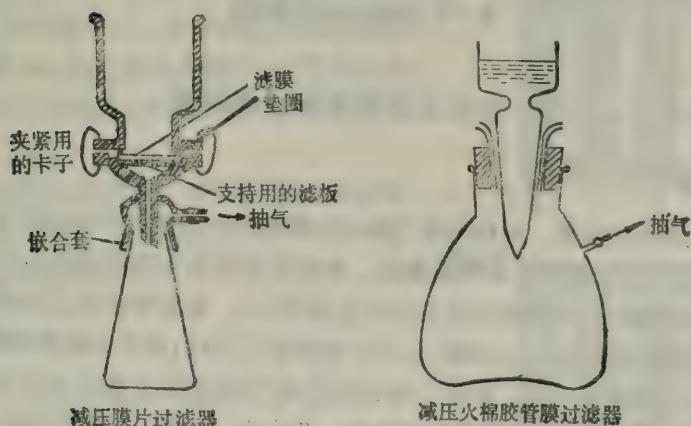


图 7-6 实验室用的特殊减压过滤装置

物料。实验室加热过滤装置如图 7-8。

(五) 其他

增加过滤面积，减少滤饼厚度等均可提高滤速。

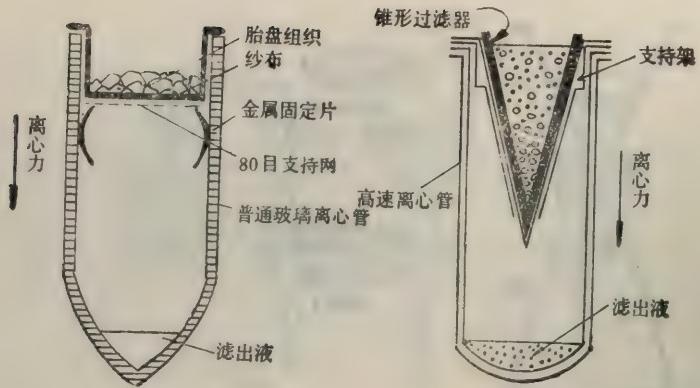


图 7-7 离心过滤装置

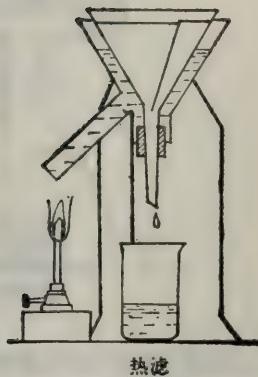


图 7-8 实验室加温过滤装置

三、生化工业常用的过滤装置

(一) 板框压滤机

它是一种加压过滤装置。结构如图 7-9。主要部分由交替排列的滤板(1)和滤框(2)组成，其中滤板又分为过滤滤板和洗涤滤板。滤板和滤框由机座两旁两条平行横梁支撑。机座(3)上有固定端板(4)和借滚轮移动的可动端板(5)。滤板和滤框之间夹着滤布，滤布上开有与滤板孔洞相通的孔。当端板(4)(5)将板框压紧时，相邻的每两个滤板与其所夹住的滤框组成独立的过滤小室。板框上缘有三个孔(有的只在上缘两角各开一孔)。中间孔为过滤液进口通道，旁边两孔为洗涤液通道。图 7-10 为滤板与滤框的放大图。

使用时按过滤滤板、滤框、洗涤滤板的顺序安装，压紧。在加入待滤液以前，先从过滤液进口通道压入清水试漏，除滤清液开关以外，它处均无水喷出。即证明滤机可用。随后通入压缩空气驱去机内试漏水，再用泵压入待滤液。图 7-11(a) 为板框压滤机的工作简图。待滤液流经滤液进口通道后，由滤板暗孔进入滤框。滤液通过滤板上的滤布，沿板上沟渠自下方旋塞开关排出。

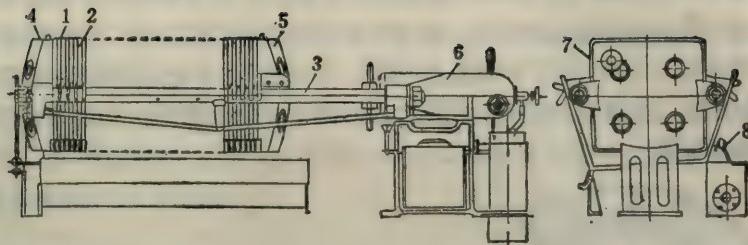


图 7-9 压滤机

1.滤板，2.滤框，3.机座，4.固定端板，5.可动端板，6.水压机，7.悬浮液，洗涤水及压缩空气的进口管，8.滤液及洗涤水的排放旋塞

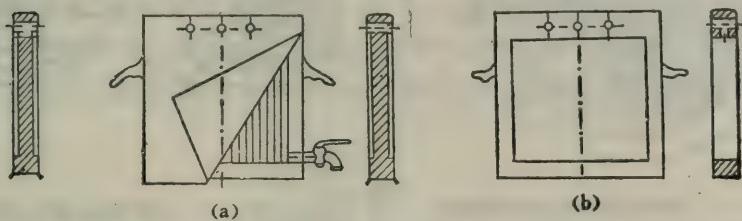


图 7-10 滤板(a)和滤框(b)放大图
(a)滤板上为滤布; (b)滤框中空

洗涤滤渣时,关闭待滤液进口通道,洗涤液由洗涤液进口通道压入,经洗涤滤板上的暗孔进入滤框,如图 7-11(b) 所示,关闭过滤滤板下的滤液排出旋塞,洗涤液透过两层滤布和全部滤渣层后排出。

板框压滤机的操作压强由待滤物的性质决定,一般为表压 2—3 个大气压。过滤中性或碱性物料多用铸铁板框。过滤酸性物料常用木板框。此外还可用铸钢,玻璃钢,硬聚氯乙烯等制成板框。它们各具有优点,使用滤板和滤框的数量一般为 10 至 60,如过滤少量物料,不需通过全部板框,可取无孔隔板插入机中,使隔板后面的板框不起作用。

板框压滤机因结构简单,操作方便,造价较低,过滤效果好,现仍广泛应用,近年又不断向机械化、自动化方向发展。

(二) 转筒真空过滤机

是一种减压过滤装置,也是生化工业中常用的过滤设备。它包括转筒分配头,料槽,真空系统、压缩空气系统及离心泵等。

当物料进入料槽后,需搅拌使固体不致沉降。料槽中置刮刀式转筒,见图 7-12。转筒内每个扇形室,有网或栅便于铺滤布。已铺滤布的转筒转动时(转速为 0.1—2.6 转/分),各室经转筒的空轴枢内的通道与固定的分配头相连。通过分配头可吸气或压气,使各区 I 各室产生

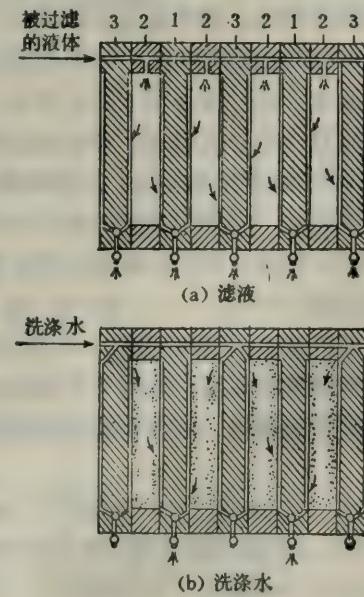


图 7-11

真空,将滤液吸入转筒各室,而固体则被阻留于筒面。转筒旋转时,滤渣随之上升到区 II 的位置,滤渣中剩余液体即被吸去。区 III 为空白区。到区 IV 时由供水管 7 喷水洗涤滤渣,又称洗涤区。区 V 又是空白区。到区 VI 时通过分配头压缩空气将转筒上已洗净吸干的滤渣吹松。转筒继续旋转,滤渣被刮刀刮下,最后转筒上的滤布在区 VIII 经蒸汽洗净重新循环使用。



图 7-12 转筒真空过滤机操作简图:

1. 转筒, 2. 分配头, 3.、4. 与减压相接的管, 5.、6. 与压缩空气相接的管, 7. 喷水管
I. 吸气过滤区, II. 滤瓶吸干区, III. V. IX. 空白区, IV. 洗涤滤饼区, VI. 吹松滤饼区, VII. 卸滤饼区, VIII. 滤饼清洗区

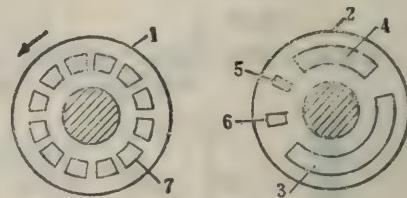


图 7-13 转筒真空过滤机分配头:

1. 转动盘, 2. 固定盘, 3. 与减压管相通的缝隙, 4. 与洗涤贮槽相通的缝隙, 5.、6. 与压缩空气相通的缝隙, 7. 转动盘上的孔

分配头是真空气过滤机的重要部件,各区的工作由它分配。分配头包括转动圆盘 1 和不动圆盘 2,见图 7-13。当转动圆盘上的孔与不动圆盘上的大缝隙 3 相对应时,扇形室即与真空泵相连。滤出液由滤液槽转入滤液承受缸。转筒转过一定角度,可顺次与 4 和 5 对应而与洗液贮槽相连。最后经孔 6 和 7 使转筒室与压缩空气管相连,以便吹干滤饼和清洁滤布。空白区是用于防止作用不同的相邻的两区相互串联而设下的缓冲区。

转筒真空过滤机适用于中等细度和粘度不大的物料。其式样较多,转筒直径可小至 30 厘米,大到 4.5 米,长度由 30 厘米到 6 米,适用范围很广。卸料方法有:

1. 刮刀法 用于剥离较厚(8—10 毫米)的滤渣,过滤困难的胶质滤渣时,每转一周阻留滤渣厚度在 5—10 毫米之间或更少时,为避免用刮刀卸料损及滤布,可用其他卸料方法,见图 7-14(a)。

2. 环行索法 (滤渣层厚 2—4 毫米) 过滤时预先将绳索嵌在滤渣内。卸料时,滤饼随绳索移动而脱落。见图 7-14(b)

3. 橡皮圆辊法 薄滤渣和粘滞滤渣被紧压在转筒表面上旋转的橡皮圆辊所卸下,

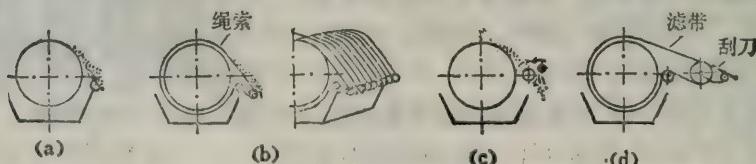


图 7-14 各种剥落滤渣的方法

a. 用刮刀 b. 用环行索 c. 用橡皮圆辊 d. 用环行滤带

在圆辊上的滤渣再用一较小直径的圆辊除去，见图 7-14(c)。

4. 环行滤带法 滤渣区特别薄时(小于 2 毫米)可用此法，滤带通过一系列圆辊，然后被刮刀卸除，滤带再经洗涤回到转筒上。其原理见图 7-14(d)

转筒真空过滤机的全部过滤、洗涤和干燥过程都在一圆面上进行，滤渣不能进行细致的洗涤和干燥。所得滤饼含水量一般为 10~30%，若要得到较干的滤饼，可将转筒的一部份罩住，通入热空气使之干燥。

(三) 加压叶片连续过滤机

它的特点是主轴每转一周，依次完成过滤、水洗、干燥、卸料四个工序，结构见图 7-15。它的效率高，密封性好，适应性强。多用于过滤粘度大、颗粒细、有毒、易挥发物料。过滤面积为 5 米²的叶片过滤机的生产能力，相当于六台过滤面积 36 米²的板框过滤机，而占地面积缩小 2/3，设备投资减少 50%，每年所用滤布量为板框压滤机用布量的 1/160。

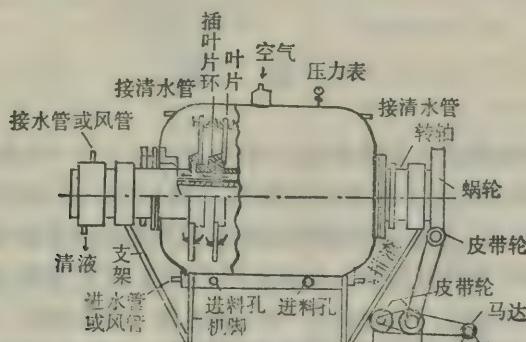


图 7-15 加压过滤机简图

(四) 其他

如叶片真空吸滤机、金属圆片压力过滤机、圆形板框压滤机、陶瓷抽滤缸等分别用于生产谷氨酸钠、柠檬酸、抗菌素及其他生化药物。

第二节 膜分离技术

早在 1861 年 Thomas Graham 就已介绍用膜分离法可从大分子(多糖、蛋白质)溶液中除去一些小分子的无机盐类^[5]。那时的膜材料多来源于动物胶，不及现用的透析膜那样精致和高效。但分离的原理还是相同的。

膜分离的原理，主要是利用溶液中溶质分子的大小、形状、性质等的差别，对于各种薄膜表现出不同的可透性而达到分离的目的。选择薄膜在膜分离法中很重要。薄膜的作用是有选择地让小分子通过，而把较大的分子挡住。分子透过膜，可由简单的扩散作用引起，或由膜两边外加的流体静压差或电场作用所推动。由上述原理衍生出的分离法有透析、超滤、电渗析、反渗透等。它们还可根据装置的不同或所用膜性能上的区别再细分。如超滤装置有静止无搅拌式、搅拌式、浅道式和中空纤维式等类型。

膜分离技术的发展和制膜工艺水平直接有关。早期用的动物膜，不论在材料来源、再生能力及分离效果上都有许多缺点。三十年代初 Elford 制成硝化纤维薄膜，可用于测定某些病毒颗粒的大小，但用这种薄膜时，流速甚慢，操作烦琐，因而未能广泛应用。后来 Craig 等对玻璃纸（赛璐玢）做的透析管进行了细致研究，用各种理化方法改变玻璃纸孔径大小，克服再生能力低，流速慢等缺点，并改进了装置使透析技术前进了一步^[6,7]。

制膜工艺的革新高潮是在近十多年出现的。工业废水处理、海水淡化试验及制盐工业的发展，医学上“人工肾脏”的研究等，使人们对薄膜的研究的兴趣大为增加。因此新的薄膜及装置应运而生，其中最重要的是各向异性的不对称薄膜或称“表层膜”。它不仅提高了膜的选择性和机械强度，而且滤速也比玻璃纸的滤速增加数十倍甚至成百倍。其次是出现了多种新装置。

目前，迅速发展的膜分离法已成为物理化学分离法中重要组成部份。它在生化制备中用于浓缩及脱盐已占压倒优势，用于分离提纯的事例逐年增加。下面分别介绍常用的几种膜分离法。

一、透析

透析法的特点是半透膜两边都是液相，一边是试验液，另一边是纯净溶剂（水或缓冲液）。试验液中不可透析的大分子被截留于膜内，可透析的小分子经扩散作用不断透出膜外，直到两边浓度达到平衡。以前透析膜两边的液相用的名称较混乱，未透出的溶液，称“不可扩散的物质”，或称“透析残留液”，而透析后的溶液称“已透析液”、“透析液”。Craig 和 King 建议使用的“保留液（retentate）”和“渗出液（diffusate）”分别代表透析后膜内外的液相，已被广泛承认。透析法多用于制备及提纯生物大分子时除去或更换小分子物质、脱盐和改变溶剂成份。近来，透析法有很大发展，透析膜和透析装置更有新的进步。

（一）透析膜

除动物膜外，羊皮纸、火棉胶和玻璃纸及最近使用的 Visking 赛璐玢透析膜，都是纤维或纤维素衍生物制成的。纤维素材料来源丰富，价格便宜，但用于制作透析膜的高聚物还应有如下特点：

1. 在溶剂中能膨胀形成分子筛状多孔薄膜。只允许小分子溶质和溶剂通过，而阻止大分子（如蛋白质）通过。
2. 具有化学惰性，不具有可以和溶质起作用的基团，在水、盐溶液、稀碱或稀酸中不溶解。
3. 有一定的机械强度和良好的再生性能。

透析膜可自制（如火棉胶）或购买，国外的透析膜常有以下几种，见表 7-1。

商品透析膜大多为管状，各公司采用的大小规格又不相同，曾引起混乱。购买时需注意，如 Visking 公司最初的透析管大小以装满水时管内膨胀直径为多少吋表示，以分数 $1/32$ 为一个单位。因此， $8/32$ 透析管的膨胀直径约为 0.25 吋（约合 0.62 厘米）。Visking 并入 Union Carbide 公司后，仍用“32”为分母基数，但商标上常略去“32”而代以透析管

表 7-1 几种商品透析膜

型 号	相当于 Visking 公司型号	扁平宽度 (厘米)	膜壁厚度 (厘米)
8	8/32	0.390	2×10^{-3}
20	20/32	0.984	8×10^{-4}
27	27/32	1.312	10^{-3}
36	36/32	1.734	10^{-3}
$1\frac{7}{8}$ SS	$1\frac{7}{8}$ SS	2.88—3.14	1.6×10^{-3}
$3\frac{1}{4}$ SS	$3\frac{1}{4}$ SS	4.65—5.10	3.5×10^{-3}

表 7-2 Union Carbide 各种型号透析管的渗透范围

型 号	近似膨胀直径(湿) (厘米)	可透过的分子量	不能透过的 分子量
8 透析管	0.62	5,732	20,000
18 透析管	1.40	3,300	5,732
20 透析管	1.55	30,000	45,000
27 透析管	2.10	5,732	20,000
36 透析管	2.80	20,000	—
$1\frac{7}{8}$ 透析管	4.70	不详,但与 8 号管大致相同	
$3\frac{1}{4}$ 透析管	8.13		

长度,如 36/100 即表示 36/32 号管每卷 100 英尺长。另外,管的膨胀直径改为公制,以厘米表示。Union Carbide 公司的几种透析管渗透范围见表 7-2。

透析管孔径大小可经机械作用和理化处理而改变。例如乙酰化作用可缩小膜的孔径,直至能阻滞甲醇分子通过,而用 64% $ZnCl_2$ 溶液浸泡时,膜的孔径可增大到能使分子量为 135,000 的大分子通过。机械法对管膜孔径的影响可因作用方向而异。线形膨胀可使孔径减小至 50%,而放射形膨胀作用由于管内液体静压力加大,可使管膜孔径增加 1—2 倍以上,表 7-3 是 Union Carbide 的二种透析管径不同处理后孔径的变化^[8]。

此外,某些小分子溶质的渗透性也因溶液中存在某些微量表面活性剂而增加,可能是由于它们吸附在膜的“活性位置”上,改变了膜的理化特性。

各种纤维素透析膜片孔径度一般不如管状膜那样易受控制,透析的有效面积也小于管状膜。实验中样品量少,用透析管较方便,而工业上大量溶液透析脱盐时,用透析膜片有利。

商品透析管膜常涂甘油以防破裂,并含有极其微量硫化物、重金属和一些具有紫外吸收的杂质。它们对蛋白质和其它生物活性物质有害,用前必须除去。McPhie 建议先用 50% 乙醇慢慢煮沸一小时,再分别用 50% 乙醇,0.01M 碳酸氢钠溶液,0.001M EDTA 溶液

表 7-3 不同处理方法对 Union Carbide 透析管孔径度的影响

透析管型号及处理方法	分子量范围
18 DC 线形膨胀和乙酰化	100—2,000
18 DC 线形膨胀	2,000—6,000
18 DC 未经处理	6,000—12,000
20 DC 未经处理	12,000—20,000
20 DC 加压放射形膨胀	20,000—45,000
20 DC $ZnCl_2$ 处理	45,000—135,000

依次洗涤，最后用蒸馏水漂洗三次，基本可除杂质^[9]。实验证明，50% 乙醇处理对除去具有紫外吸收杂质特别有效。已处理好的管膜如果不用，可贮存于4℃蒸馏水中。如需长期贮存，可加少量叠氮化钠、氯仿以防细菌侵蚀。再用时需用蒸馏水充分漂洗，再以透析时用的溶剂漂洗，然后灌入溶剂，仔细检查，不漏即可用。

(二) 透析方法及装置

透析方法较简单，可将已处理及检查过的透析袋用绒线或尼龙丝扎紧底端，然后将待透析液(1—100毫升)从管口倒入袋内。但不能装满，常留一半左右的空间，以防膜外溶剂大量透入袋内时将袋胀裂，或因透析袋膨胀，而引起膜的孔径大小改变。装透析液后，即紧扎袋口，悬于装有大量纯净溶剂(水或缓冲液)的大容器内(量筒或玻璃缸)如图7-16, 7-17所示^[10]进行透析。小分子(水或盐)可从透析膜内透出，直到膜内外浓度相等。如用透析膜片，实验室中简易装置也可装配如图7-18^[11]：在二个刚好可以互相套叠的有

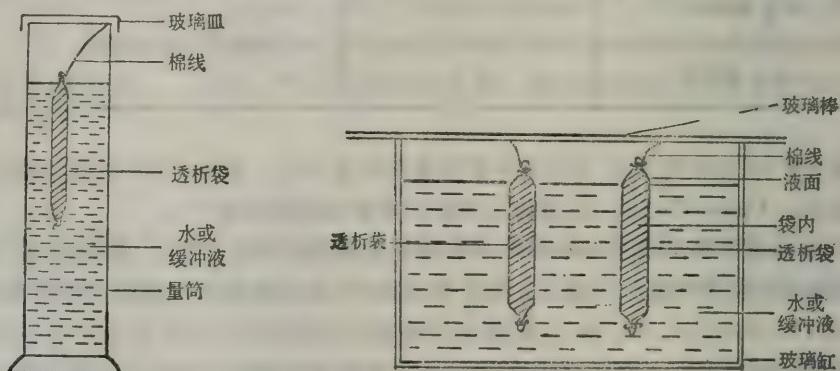


图 7-16 透析袋透析简单装置

图 7-17 另一种透析袋透析简单装置

机玻璃圆筒中间夹入透析膜，箍紧，使透析膜表面平坦，然后平放于漏斗中。漏斗架在烧杯上，漏斗口径应比烧杯大4—6公分，烧杯高度应能容纳漏斗，使其末端不接触烧杯底部。在烧杯中放入水或缓冲液。液面高度以刚触及透析膜为好，用玻璃皿盖住漏斗，以免杂物污染。如需冷却，可在冰箱内进行。此法简单，安全，适用于少量样品脱盐。实验室小型透析装置常加上搅拌以及定期(或连续)换上新鲜溶剂，这样均可大大提高透析效果。近来，国外设计透析装置多是如此。现举例如下：

1. 旋转透析器 在透析容器下安装电磁搅拌器。但这只能消除膜外溶剂的浓度梯度，而不能消除膜内溶剂的浓度差。Feinstein介绍的透析装置，可使膜内外两侧液体同时

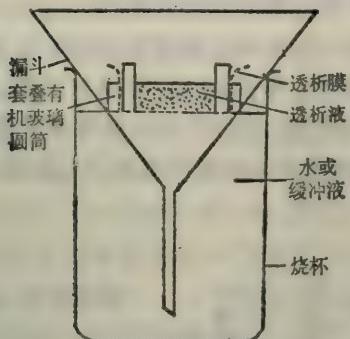


图 7-18 用透析膜片透析简单装置

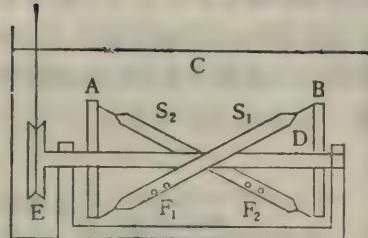


图 7-19 旋转透析器简图

C—盛水或缓冲液容器；A、B—木轮；D—横轴；S₁、S₂—透析袋；F₁、F₂—玻璃珠；

流动，使透析速度大大增加，Feinstein 的旋转透析器如图 7-19 所示^[12]。

图中，C 为装有大量水或缓冲液的容器（可用玻璃或塑料制成），D 为横轴连接二个木轮 A、B，横轴末端为滑轮 E，它通过传动带与马达相连，转速约 4 转/分。透析袋 S₁、S₂ 成对角线拴紧在 A、B 木轮的两端。当 D 轴转动时，S₁、S₂ 即绕着横轴作圆周运动。由于透析袋安装成交叉状，与横轴不平行，因此 D 轴转动时透析袋中液体即上下流动。必要时还可在袋中放几颗玻璃珠（F₁、F₂）。增加袋内液体搅拌速度。轴 D 及轮 A、B 的转动，也对透析膜外溶液起搅拌作用。这种简单装置可放 8—10 个透析袋，透析速度比图 7-16, 7-17 示意的装置约快 2—3 倍。

按上述原理尚有多种设计。有的仪器将许多透析袋悬挂在环状圆筒上，圆筒放入盛有溶剂且装置搅拌器的大容器中，由马达带动旋转。这种装置一次可放 8 个透析袋，每袋装样液 24 毫升。较大的装置一次可放 16 个透析袋，每袋装样液 220 毫升。这种装置国外已有生产。有的仪器除了由鼓轮引起旋转外，还用一凸转轴使透析袋产生 10—30° 角的振动。这种振动透析器透析 0.1M 氯化钠仅需 2—3 小时即达到平衡。

2. 平面透析器 圆筒形透析管虽然使用较方便，孔径易控制，但透析面积较小。Katz 等介绍了平面透析器装置，见图 7-20^[13]。将透析管装在长方形塑料框内，利用塑料框把透析管张开，成为很薄的平面透析器。然后把它的两端连接到转动装置上，通过电磁转动器使它缓慢转动。透析器外面是盛有溶剂的玻璃缸或塑料箱，这种透析器一次即可装样液 0.5—20 毫升。效率比管状旋转透析又有提高。

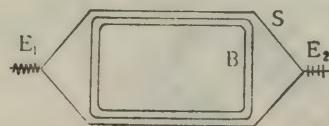


图 7-20 平面透析器简图

S—透析袋；B—方形塑料框；E₁、E₂—透析袋两端接旋转装置

3. 连续循环透析器 上述各种装置在膜内外可透析物质达到平衡后必须更换新鲜溶剂，才能使可透析物质继续通过透析膜向外扩散，通常要更换 3—4 次溶剂，这比较麻

烦。Hospethom 介绍的简单装置如图 7-21^[14]。用一根很长的粗棉线缠绕在两端扎紧的长透析管上，棉线缠绕的螺距应适当，以保证透析液有一定流速。溶剂可沿棉线自上而下流动把透析管中扩散出的小分子不断移去。用这种装置，可使 50 毫升 0.9 M 硫酸铵溶液在 18/32 透析管内对蒸馏水透析，7 小时后除去 99% 的盐，见图 7-21。连续循环透析器如用水透析可在冷室敞开进行。如用缓冲液透析，则需密封以防缓冲液蒸发而使浓度改变，装置见图 7-21 (b)。

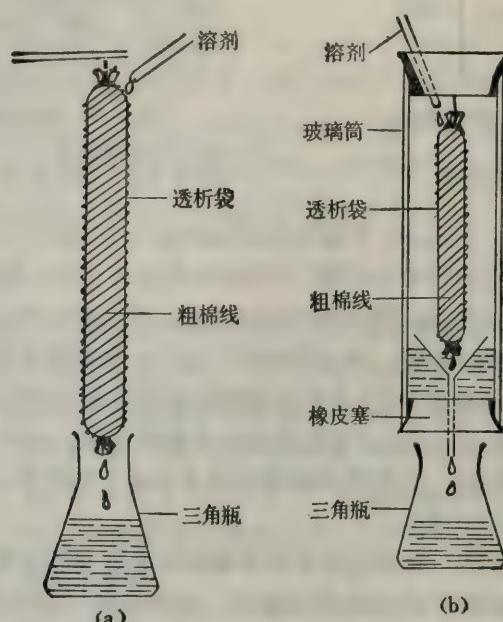


图 7-21 连续循环透析器

(a) 开放式；(b) 密封式

连续透析装置有多种，其原理都是使溶剂更新以加大膜内外的浓度差，提高透析速度。此种装置除用于分离浓缩外，还可用于酶促连续反应。我国轻工业部食品发酵工业研究所试验天门冬氨酸酶促合成时，用连续透析法使酶和底物溶液分别缓慢流入用半透膜隔开的压滤机形式的连续透析器中进行反应，可提高酶的利用率和避免渗入杂质。天门冬氨酸转化率达 99% 以上^[15]。较复杂的透析装置有：空心纤维透析器、线流连续透析

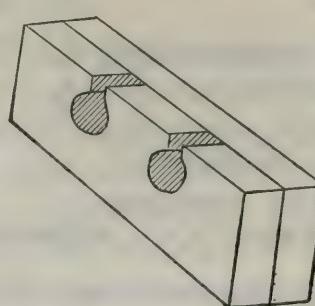


图 7-22 色谱用微量透析器

器、薄膜反流连续透析器等，其透析效率远大于简单装置。

4. 层析用的微量透析器 有时柱层析收集的各组小量样品必须分别进行层析。用透析袋在同一条件下同时透析小量样品是很困难的。Reitz, A. H. 和 Rilet, W. H. 介绍的方法是^[16]：在一块平滑的硅化橡胶上挖许多小洞（如图 7-22），每个洞可放样品 0.025—0.5 毫升，另在一块对应的有洞硅化橡胶的洞中放溶剂，用平面膜把样品和溶剂隔开，进行透析。如需移去透析物，即在溶剂一侧开一浅沟，使透析液连续流出。安装时将二块橡胶（中间夹着膜）用夹子紧固即可。

5. 反流透析器 它使样液和溶剂在膜两侧反向缓慢流动，既有较大的透析面积，又能使膜内外溶液浓度差达到最大限度，透析效率极高，透析的样液体积很大。Craig 和 Stewart 设计很简单的反流透析器^[17]，见图 7-23。样液由输入泵注入后，通过内管从膜的底端上升。而溶剂从膜另一侧上端往下流动。使膜两侧分别形成不同流向的薄液层。膜外液层因马达带动外管转动而流动，可进一步提高透析效率。调节输入泵和输出泵的流速可以控制透析速度。Craig 和 Stewart 用六种溶液测定透析效率，结果见表 7-4。

6. 减压透析 其原理是在渗出液外抽真空使膜两边形成压差，加速膜内物质透出。

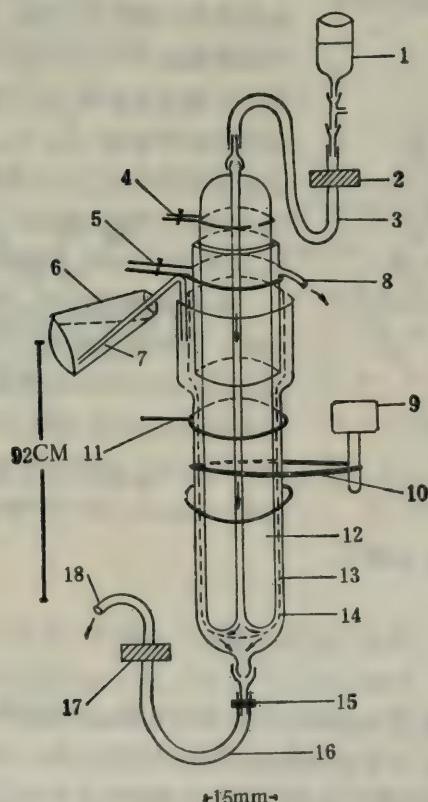


图 7-23 薄层反流透析器

1. 透析溶液；2. 溶液输入泵；3. 聚四氟乙烯管；4. 支持夹；5. 支持夹；6. 溶剂；7. 虹吸管；8. 透析后保留液出口；9. 马达；10. 皮带；11. 轴承；12. 内管（中空）；13. 透析膜；14. 外管（旋转）；15. 支持夹；16. 聚四氟乙烯管；17. 透析后渗出液；输出泵；18. 透析后渗出液；出口

表 7-4 两种不同膜在 25°C 进行薄层反流透析的比较结果(慢泵速)

溶质品称	No. 18 Visking 膜			No. 20 Visking 膜		
	出口流速 (毫升/分)		滤除百分率	出口流速 (毫升/分)		滤除百分率
	保留液	渗出液	(%)	保留液	渗出液	(%)
色氨酸 ($2.46 \times 10^{-3} M$)	0.36	1.00	94.2			
蔗糖 (1%)	0.43	1.16	86.1			
杆菌肽 ($1.92 \times 10^{-3} M$)	0.37	0.97	64.0	0.39	1.25	70.5
1N NaCl	0.44	1.00	99.7	0.33	1.18	99.7
3% 硫酸铵	0.43	1.00	97.9	0.48	1.20	98.7
50% 硫酸铵	0.73	0.98	94.3	0.40	1.18	93.1

其装置见图 7-24, 图中 D 为一个 15—60 厘米长的 Union Carbide 8 号透析管, 下端用线扎紧, 放入真空抽滤瓶(F)内。透析管上端套塑料管(T), 再通过橡皮塞(S) 中央小孔, 与分液漏斗(R) 的管口直接相通, 控制分液漏斗活塞开关, 把样液加入透析管内。抽真空后, 将抽滤瓶抽滤嘴处橡皮管夹紧, 即可减压透析。必要时可将装置放入冰箱内透析至平衡。操作时, 要预先估计透出液体积, 加上原有溶剂, 使抽滤瓶内最高界面不得超过(L) 处。如选用其它透析膜管, 应测试其耐受压力(不得低于一个大气压)。在 4 °C, 700—750 托 (Torr) 时, 滤速为 0.6—0.7 毫升水/厘米管/小时。此装置使用方便。效果很好。

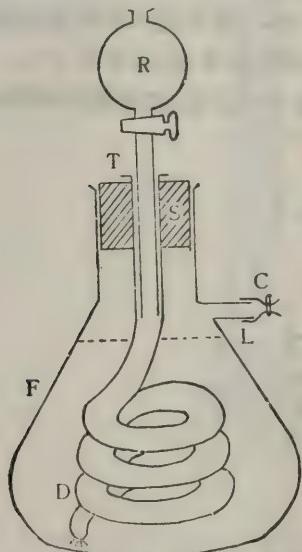


图 7-24 减压透析装置

D—透析管膜, R—分液漏斗, S—橡皮塞, T—塑料管套, C—夹子, F—真空抽滤瓶

有关装置及原理请参看本章超滤部份。

二、超 滤

超滤是加压膜分离技术之一, 操作简便, 成本低廉, 分离效率高, 且不引起温度、离子状态及相的变化。近来广泛用于生物制品、食品和制药工业、三废处理及其它浓缩、脱盐及分级分离工序。至今, 国内外已有很多关于超滤原理及应用的专著、评论及文献^[19-23]。

超滤原理和一般过滤一样, 主要依赖于被分离物质分子量的大小、形状和性质不同, 在一定的压力差(外源 N₂ 或真空泵压)下, 使小分子能够通过具有一定孔径的特制薄膜, 限额以上的大分子被膜阻留, 使不同大小的分子得以分离。要在膜的两边产生压差, 可在样液一边加正压或在超滤液一边产生负压。前者应用较多, 因为抽真空产生的负压差不

超过一个大气压，超滤效果差。所以超滤通常是指外源加压的膜分离。根据所加的操作压和所用膜平均孔径的不同，可分为微孔过滤、超滤和反渗透三种。

微孔过滤所用操作压在每平方吋 5 磅以下，膜的平均孔径为 500 埃至 14 微米，用于分离较大颗粒。

加压超滤所用操作压为 5—100 磅/吋²，膜的平均孔径为 10—100 埃，用于分离大分子溶质。

反渗透作用操作压比超滤更大，常达 500—2000 磅/吋²，膜的平均孔径最小，一般为 10 埃以下，用于分离小分子溶质。

超滤与反渗透及微孔过滤的比较见图 7-25, 7-26^[19]。

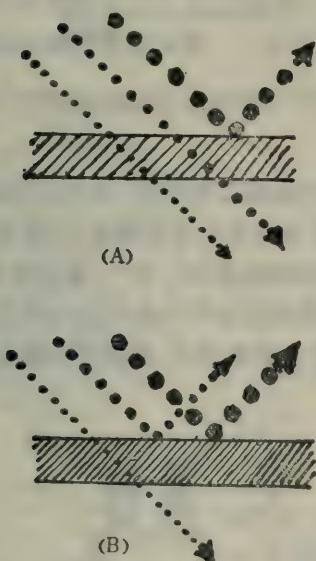


图 7-25 超滤 (A) 与反渗透 (B) 的比较(示意图)

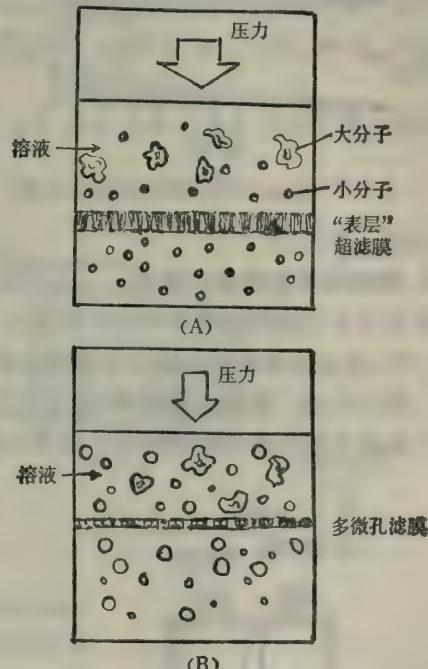


图 7-26 超滤 (A) 与微孔过滤 (B) 的比较(示意图)

(一) 超滤过程及装置

超滤在密封的容器中进行，外源压力迫使溶质通过薄膜。开始时溶质分子在溶液中均匀分布，后来由于小分子溶质通过膜，而大分子溶质被截留于膜面，渐形成浓度梯度，称为浓度极化现象。大分子溶质在膜上的堆积层（或称浓缩层），就好似超滤膜上附加的次级膜，因此，溶质滤过时必须首先通过这层次级膜。见图 2-27。随着大分子溶质堆积层的加厚，膜的选择分离能力愈来愈低，流速也越来越慢。如用各向同性微孔薄膜，经常会堵塞，而完全丧失过滤能力。为此，设计超滤装置时，都力求克服浓度极化，增加流速，提高选择分离效率。现有装置一般可分四种类型。

1. 封闭系统无搅拌式装置 它比较简单，没有搅拌装置，浓度极化较严重。而且膜的使用面积小，滤速慢，常需较大压力。因此只适于浓缩小量稀溶液。早期装置如图 7-

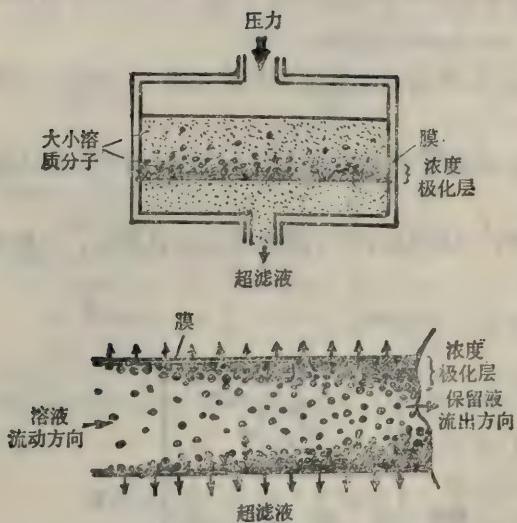


图 7-27 超滤过程的浓度极化现象示意图

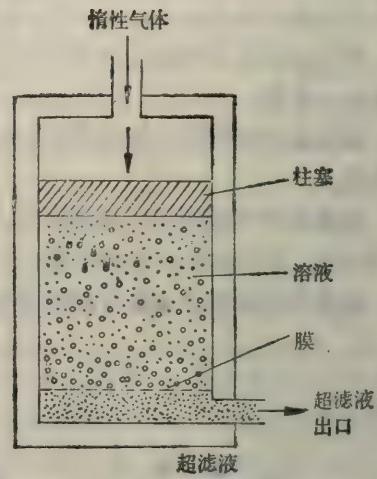


图 7-28 封闭系统无搅拌式超滤装置示意图

28. 目前已不常用。

2. 封闭系统有搅拌式装置 超滤室内溶液中放铁芯搅拌棒，室外底部的电磁搅拌器通电后可带动搅拌棒缓慢转动。搅拌作用减少了溶液浓度极化现象，使滤速大大提高，见图7-29。北京植物研究所设计的搅拌式超滤器的剖视图见图7-30^[24]，超滤器由盖、筒身、筒底三部份组成。盖用金属制成，盖上有加样器和连接压缩气钢瓶的进气口，以螺旋结构和橡胶垫圈使盖和筒身保持密封。筒身和筒底用有机玻璃制成，筒身管壁厚度为4毫米。

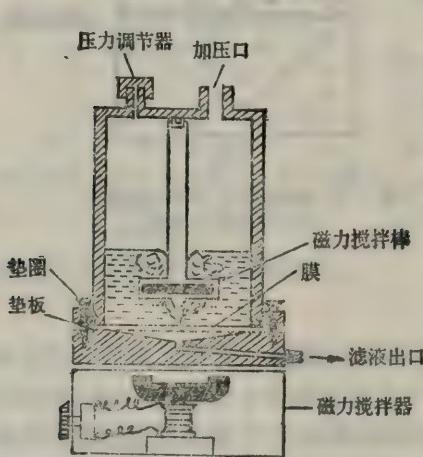


图 7-29 封闭系统有搅拌式超滤装置

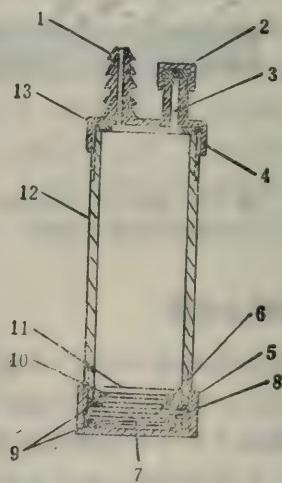


图 7-30 搅拌式超滤器剖视图

- 1. 进气口 2. 加样口盖 3. 加样口 4. 盖 5. 有机玻璃底筒
- 6. 超滤膜 7. 尼龙布 8. 支持板 9. 橡胶垫圈 10. 塑料杯
- 11. 磁搅拌棒 12. 有机玻璃筒身 13. 橡胶垫圈

筒身底部装有硬塑料环，密封在玻璃管中的铁棒(磁搅拌棒)位于此环上。滤膜、尼龙布、支持板装在筒身与筒底之间，筒身和筒底以螺旋结构和橡胶垫圈保持密封，支持板是有小孔

的塑料板或不锈钢板。超滤器操作压力是由压缩气钢瓶经减压器从进气口供给的。压力受减压器控制。超滤器装在磁力搅拌器上，由磁力搅拌器带动超滤器内的磁搅拌棒转动，滤出液收集在结晶皿内。所用的二醋酸纤维超滤膜，也是植物研究所自制的，超滤时膜的有效面积为6厘米²；压力为3公斤/厘米²，8小时内可将100毫升的Mo-Fe蛋白浓缩至10毫升，蛋白质浓度由3毫克/毫升增至30毫克/毫升，这种超滤器结构简单，使用方便，国内已有不少商品供应，用于生化实验。

3. 浅道系统超滤装置 这类装置使液体通过螺旋形浅道，向与膜平行的方向流动。浅道底部有膜，由于液体在膜面高速流动，浓度极化不显著。而且液体与膜接触的面积也大于一般搅拌型装置，故有很高滤速。浅道系统见图7-31(a)，装置见图7-31(b)。超滤后被截留的大分子溶液从浅道末端流出，通过蠕动泵再循环超滤，见图7-31(b)，最后浓度可达40%。该装置适用于大分子混合液的分级分离，生物制备中细菌、病毒、热原的滤除及生物大分子溶液的浓缩、脱盐等。

4. 中空纤维系统超滤装置 它由很多根空心纤维丝成束地装配组成。每根纤维丝

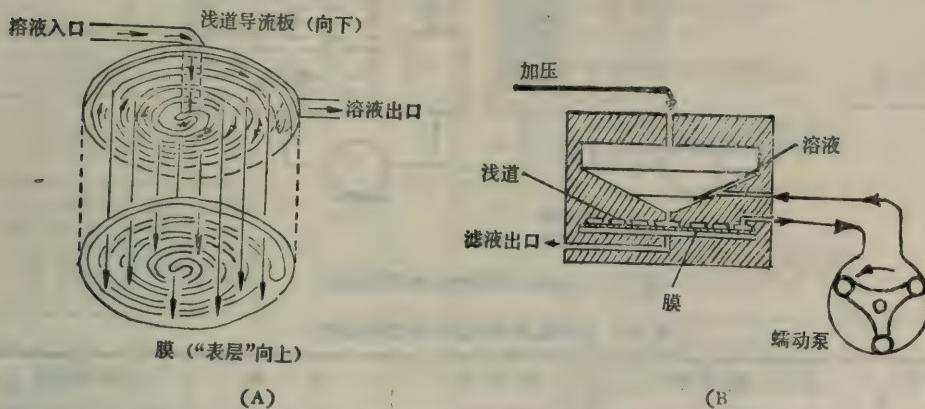


图 7-31 浅道系统超滤示意图
(A) 超滤过程, (B) 超滤装置

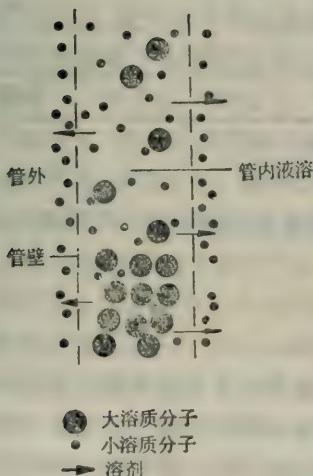


图 7-32 空心纤维膜超滤示意图



图 7-33 PM-空心纤维膜横切面扫描电镜图(放大 400 倍)

即成为一个微细管型膜(相当于一个超滤单位),如图 7-32。纤维丝横切面内壁的“表层”细密,向外逐渐疏松,形成各向异性微孔膜管结构。图 7-33 为 PM-空心纤维膜横切面的扫描电镜图。空心纤维管的内径一般为 0.2 毫米,有效面积约 1 厘米²,表面积与体积的比率极大,所以滤速很高。例如 DC-30 型中空纤维系统超滤装置共有三根装有许多中空纤维膜管的套筒,膜表面积达 2.7 米²,在 3 个大气压下滤液流量可达 1 升/分。中空纤维用于透析、脱盐,不到 1 小时即可从溶液除去 99% 的盐。装置见图 7-34。

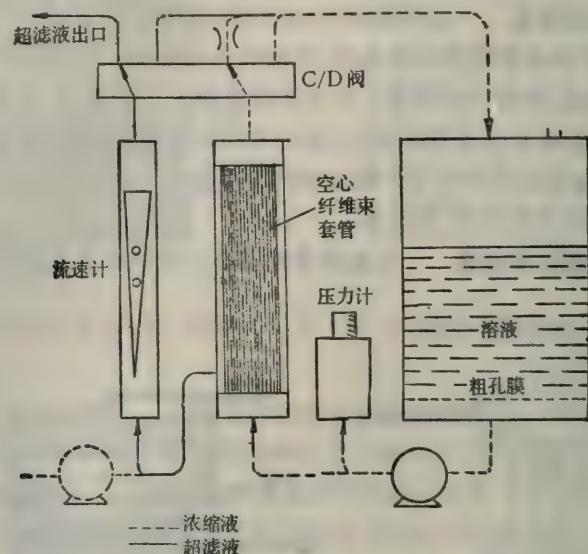


图 7-34 中空纤维系统超滤装置简图

表 7-5 各种超滤系统滤出液流量比较*

系 系统	膜 面 积 (平方厘米)	操作 压 (磅/吋 ²)	流 量 (毫升/分)	标准流量 (毫升/分·厘米 ² ·磅时)
非搅拌型	3.4	70	0.05	0.002
搅 拌 型	39	50	2.7	0.0014
浅 道 型	40	25	8.0	0.008
中空纤维	900	7**	50.00	0.007

* 超滤材料为 1% 牛血清白蛋白,用分子量规格为 10,000 的膜截留。

** 平均的透膜压力。

以上几种实验室超滤装置的规格、用途及滤出液流量的比较见表 7-5 及表 7-6^[19]。

(二) 超滤膜的选择及使用

商品膜的型号甚多。在选择时,一般应注意以下指标。

1. 额定截留水平 表示每种超滤膜所规定截留溶质分子量的范围。在这个范围内绝大多数溶质分子能被膜截留。截留分子量愈大,膜的表观孔径愈大,反之表观孔径愈小。一般选用额定截留水平稍低于所分离、浓缩的溶质分子量。由于额定截留水平常以球状溶质分子所得的测定结果表示,故纤维状或不规则的溶质分子还应根据实际情况在

表 7-6 几种实验室超滤装置的规格及其用途

过滤系统	商品型号	处理容量(毫升)		处理浓度%		滤膜规格		用 途	备注
		最低	最高	最初	最终	直径(微米)	面积(平方厘米)		
搅拌型	12 型	1.0	10			25	3.6	适用于溶质大分子的浓缩及脱盐,如处理蛋白质、多肽、多糖或血液组份、脊髓液、尿及其他体液处理。	使用 MT ₂ 搅拌台,滤室用化学药剂灭菌,有的滤室可高压灭菌,低温操作
	52 型	2.5	65			43	12.5		
	202 型	5.0	200	0.05	5	62	27.5		
	402 型	10.0	400			76	39.2		
	2000型	60.0	2000			150	162.0		
浅道系统	TCF ₁₀	10.0	600			90	40	适用于溶质大分子混合液的分级分离,如处理生物制品细胞悬浮液、血清、糖浆等,回收发酵液中的代谢产物,滤除细菌、病毒、热源。	用化学药剂灭菌,低温操作
	TCE	300.0	1950	0.05	40	150	138—690		
	CEC ₁	—	无限			90	43		
中空纤维	DC ₂	1000	2000			900	适用于浓缩及脱盐,如处理蛋白、酶、病毒、类毒素、浸出液胶体产物等	同 上	化学药剂灭菌,低温操作
	CH ₃	500	无限	0.4	20	900			
	DC ₅₀	5000	无限			28×10 ³			
无搅拌型	10PA	0.2	14	—	1	25	3.6	适用于浓缩小量稀的活性物质溶液(低于 1% 的大溶质分子溶液)以及快速研究或分析临床样品	低温操作

额定截留水平上限加以选用。国外常见商品超滤膜的型号及性质见表 7-7^[23]。Amicon 厂所生产的 Diaflo 型号的十种超滤膜对 20 种不同溶质的阻留率及 11 种空心纤维对八种不同溶质的阻留率分别测定结果见表 7-8(a)、7-8(b)。

2. 流率 可用在一定压力下每分钟通过单位面积膜的液体量来表示(一般用无离子水进行测定)。实验中常用毫升/厘米²/分表示流率单位。工业上测定流率(通常加仑/呎²/分表示简称 GFD)时,需注明条件才能比较。如 UM、PM、XM50、DM 膜流率的测定规定时间为 5 分钟,压力为 55 磅/吋²,而 XM300、XM100A 膜流率测定规定时间也是 5 分钟,但压力为 10 磅/吋²。流率大小不仅和膜的表观孔径大小有关,而且和膜的结构类别有关。例如早年的各向同性的微孔超滤膜[见图 7-35(a)]和近年发展的各向异性不对称超滤膜[见图 7-35(b)、(c)、(d)]作比较,虽然膜的表面孔径大小一致,但各向异性不对称超滤膜的流率却大得多。它是由很薄的表层(0.1 微米或以下)和较厚的多孔基层(200—250 微米)粘合而成。表层非常薄,有圆锥形(或喇叭形)的孔道,因此溶剂通透性极好,流量大,不易被溶质阻塞。多孔基层厚度大,可以增加膜的机械强度。而且,表层膜选择性高,商品规格多,合成膜时各种性质易于控制,质量指标较有保证。因此,这种超

表 7-7 一些常见商品超滤及透析膜的性质

型 号	制造单位	组成材料	水透过性 毫升/厘米 ² /分 (100 磅/吋 ²)	分子量截留值 (保留 80—100%)
PEM 膜	Gelman	均质纤维素	0.02	60,000 (白蛋白)
Diaflo UM-0.5	Amicon	高分子电解质络合物(离子交换膜)	0.05	340 (蔗糖)
Diaflo UM-2	Amicon	高分子电解质络合物	0.1	600 (棉子糖)
Diaflo UM-10	Amicon	高分子电解质络合物	0.3	10,000 (葡聚糖 10)
Diaflo PM-10	Amicon	芳香族多聚物	0.5	10,000 (细胞色素 c)
Diaflo PM-30	Amicon	芳香族多聚物	0.7	30,000 (卵白蛋白)
Diaflo XM-50	Amicon	烯类物质	0.7	50,000 (白蛋白)
Diaflo XM-100A	Amicon	烯类物质	0.9	100,000 (7S 球蛋白)
Diaflo XM-300	Amicon	烯类物质	1.1	300,000 (硫铁蛋白)
HFA-100	Abcor Inc	非均质纤维素	0.07	10,000 (葡聚糖 10)
HFA-200	Abcor Inc	非均质纤维素	0.4	20,000 (葡聚糖 20)
HFA-300	Abcor Inc	非均质纤维素	1.4	70,000 (白蛋白)
PSAC	Millipore Corp	非均质纤维素	0.33	750~1250 (溴甲酚绿)
PSED	Millipore Corp	非均质纤维素	0.75	25,000 (α -胰凝乳蛋白酶)
PSDM	Millipore Corp	非均质纤维素	1.00	40,000 (卵白蛋白)

滤膜对克服以往超滤速率和选择性都不高的缺陷，起了极重要作用。

3. 其他 除考虑额定截留水平和流率外，还应了解各种超滤膜的使用条件和注意事项。例如：

(1) 操作温度：UM、XM、HX、OM 型膜耐受温度不超过 50℃，而 PM、HP 膜耐受温度可高达 120℃。

(2) 膜的无菌措施：一般可用 5% 甲醇、70% 乙醇、环氧乙烷（浓度不超过 20%）。有的超滤器（如 H1P8、H1P10、H1P100 和 10P100、H10P8 等型号）可高压灭菌，有的超滤器（如 H1P5 和 H10P5 等型号）则不能高压灭菌。

(3) 可用的溶剂与禁用的溶剂和药物：不同型号的膜也不完全相同。需先查明膜的配伍性。例如，DM 型膜禁用强碱、氨水、肼、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、二甲基乙酰胺

表 7-8 (b) Daffo 超滤膜的溶质分子阻留率 (15)

溶质分子名称	分子量	阻留率 (%)						CF_{50} (1000×g)
		$\text{UM}_{6,*}$ (55)	UM_2 (55)	UM_{10} (55)	PM_{10} (55)	UM_{30} (55)	PM_{30} (55)	
D-丙氨酸	89	80	0	0	0	0	0	0
DL-苯丙氨酸	165	90	0	0	0	0	0	0
色氨酸	204	80	0	0	0	0	0	0
蔗 糖	342	80	50	25	0	0	0	0
棉子糖	594	90	—	50	0	—	0	—
杆菌肽	1400	75	60	50	35	—	—	—
菊 粉	5000	—	80	60	—	5	—	—
葡聚糖 T10	10000	—	90	90	—	—	—	—
细胞色素 c	12400	>95	>95	90	—	—	—	10
聚乙二醇	16000	>95	>95	80	—	—	—	—
肌红蛋白	18000	>95	>95	95	<85	60	35	60
α -胰蛋白酶原	24500	>95	>98	>95	>95	90	75	25
胃蛋白酶原	35000	>99	>99	>99	>95	—	—	40
卵清蛋白	45000	>99	>99	>99	>99	—	—	—
红血球	64000	>99	>99	>99	>99	>95	95	45
白蛋白	67000	>98	>99	>98	>98	>90	45	10
葡聚糖 110	110000	>99	>99	>99	>99	—	20	5
醛缩酶	142000	>99	>99	>99	>99	—	>99	—
免疫球蛋白 (7S)	166000	>98	>98	>98	>98	>98	>98	90
脱铁铁蛋白	480000	>98	>98	>98	>98	>98	>95	85
免疫球蛋白 (19S)	960000	>98	>98	>98	>98	>98	>93	>98

* 膜的型号,下面括号为操作压力(磅/吋²);右起第一栏括号内为离心力(单位为 ×g)

表 7-8 (b) Diaflo 空心纤维膜的溶质分子阻留率

溶质分子 名称	分子量	阻留率 (%)*				
		H ₁ P ₂	H ₁ P ₅	H ₁ P ₁₀ H ₅ P ₁₀	H ₁ ×50	H ₁ P ₁₀₀ 10×140
		H ₅ P ₂	H ₁₀ P ₅	H ₁₀ P ₁₀	H ₁₀ ×50	
棉子糖	594	0	5	—	—	—
多聚-DL-丙氨酸	1,000~5,000	65	—	—	—	—
胰岛素	5,000	—	15	0	0	0
PVP K ₁₅	10,000	80	70	50	0	0
肌红蛋白	17,000	>98	95	90	30	0
PVP K ₃₀	40,000	>98	85	70	50	15
白蛋白	67,000	>98	>98	>98	90	20
PVP K ₄₀	160,000	>98	>98	>98	—	70

* 测定条件: 10psi (0.7 公斤/厘米²)。

PVP = Polyvinylpyrrolidone 聚乙烯吡咯烷酮。

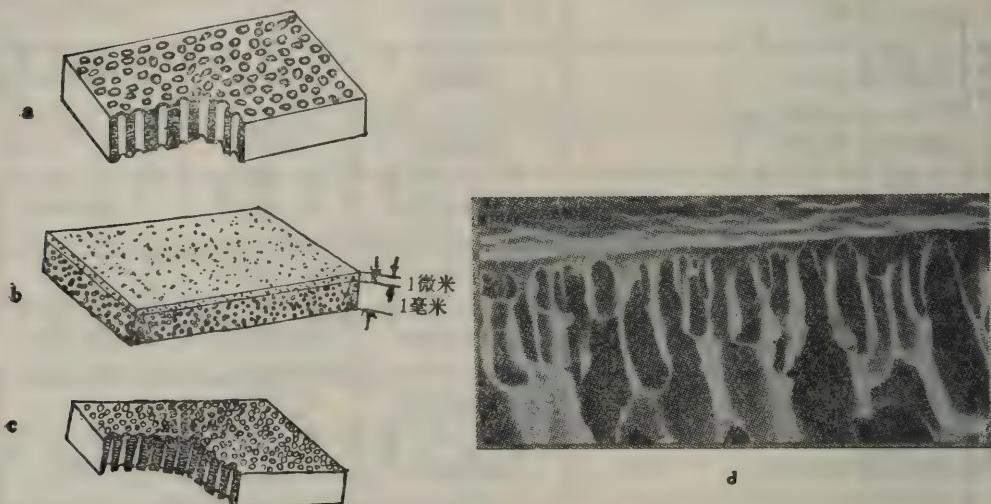


图 7-35 不同类型超滤膜的纵切面模式图

a. 各向同性微孔膜, b. 各向异性扩散膜, c. 各向异性微孔膜 d. Nucleopore UF 膜的显微照相

和 m-Pyrol; XM、HX 型膜禁用丙酮、乙腈、糠醛、硝基乙烷、硝基甲烷、环酮、胺类和二甲基甲酰胺等; UM 型膜禁用强离子表面活性剂和去污剂。可用的溶剂不能超过一定浓度, 如磷酸缓冲液浓度不能大于 0.05M, HCl 和 HNO₃ 溶液浓度不能超过 10%, 酚浓度不能超过 0.5%, 碱的 pH 值不能大于 12; PM 和 HP 型膜禁用芳香烃、氯化烃、酮类、芳香族烃化物、脂肪族酯类、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、m-Pyrol 和浓度 >10% 的磷酸等。

此外, 由于各种膜的化学组成不同, 对各种溶质分子的吸附情况也不相同。使用膜时, 应选择尽量少吸附溶质的。某些缓冲液如会改变膜对溶质的吸附能力, 就应改用其它缓冲液。例如磷酸盐缓冲液常增加膜的吸附作用, 改用三羟基甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲液或琥珀酸缓冲液, 则可减少溶质的损失和保证超滤时溶剂的正常流速。

4. 保存 超滤膜较稳定,如使用适当,能连续用1—2年。暂时不用,可在1%甲醛溶液或5%甘油溶液中保存,避免细菌侵蚀及干燥。

(三) 各向异性醋酸纤维素超滤膜的制备

国外超滤膜类型很多,我国北京、上海等地近年来也开始研制各种超滤膜。并已有少量商品供应市场。

超滤膜可由二乙基纤维素或硝基纤维素(Collodion),或二者混合制成,称为纤维性膜。另一种是为适应医药、食品工业上灭菌的需要而研制的非纤维性膜,主要用聚偏二氟乙烯、各种芳香族多聚物,尼龙等材料制成。实验室中需要的各向异性表层超滤膜可按照Van Oss的方法制备^[25]。中国科学院植物研究所制备CA₈₀各向异性醋酸纤维素表层膜的方法如下^[24]:

1. 制膜材料

成膜剂:二醋酸纤维素(结合酸54.5—56%,粘度500厘泊,上海生产)。

溶剂:丙酮(影响制膜液的粘度)。

添加剂:甲酰胺(影响膜的性能)。

2. 制膜液的配制

将25克醋酸纤维素、100毫升丙酮、80毫升甲酰胺加入密闭容器内,间歇搅拌使其溶解(防止丙酮过量挥发)。待醋酸纤维素全溶后,用二层粗棉布、一层尼龙布在3公斤/厘米²压力下过滤,得淡黄色清亮粘稠滤液,室温静置12小时,待滤液中小气泡完全消失后,立即制膜(时间过长膜液变性,呈棕红色,影响膜的质量)。

3. 制膜方法

工具:表面平滑的玻璃板或特制的抛光玻璃板数块,刮膜刀可用表面平直的玻璃管、玻璃板或金属板制成,刀面平滑而窄,两端缠绕细铜丝(直径0.27毫米)以控制膜的厚度(经蒸发和浸水后实际厚度约为0.14—0.17毫米)。

制膜条件:最好在恒温($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$)、恒湿(相对湿度75—80%)下进行,成膜时冷浸水温度控制在4—5℃。

刮膜:将制膜液倒在玻璃板一端,用刮刀均匀刮膜,刮 13×25 厘米的膜约需5秒钟。刮膜后蒸发5秒钟,立即把带膜的玻璃板浸入冰水,一小时后,从玻璃板上取膜。贴着玻璃板的膜面为反面,取膜后应做上识别标记。用膜时需将正面向着被超滤的溶液。制成的膜贮于0.02%的叠氮化钠(NaN₃)的水溶液中备用。

膜刮好后在空气中停留时间(蒸发时间)越长,膜孔径越小。粘稠溶液表面的溶剂蒸发最快,醋酸纤维素分子会浓缩形成微密表层,妨碍底层溶剂蒸发。冷浸时溶剂和添加剂逐渐被漂洗出来,醋酸纤维素分子形成凝胶而沉积下来,由于表层沉积作用最强,故结构更严密。而底层沉积作用弱,结构较疏松,形成较大的孔径。这样就形成了表层和底层结构不同的各向异性超滤膜。

Edberg, Bronsen 和 Van Oss指出^[26,27],在一定条件(室温、湿度、蒸发时间、冷浸温度和时间)下,改变甲酰胺与醋酸纤维素、丙酮的配比,可制备不同孔径的膜。如甲酰胺和丙酮之比为50/65(V/V)时,可获得截留分子量35·000的孔径;甲酰胺与丙酮之比如为35/65(V/V),即可获得截留分子量23·000的孔径。随甲酰胺量的增加,膜的孔径增大。

(四) 影响流率的几个因素

除了上述膜的结构性质起重要作用外,流率还受以下因素影响:

1. 溶质的分子性质 包括溶质分子大小、形状和带电性质。一般来说,比重大的纤维状分子扩散性差,对流率影响较大。在一定压力下浓缩至一定程度时,大溶质分子很容易在膜的表面达到极限浓度而形成半固体状的凝胶层,使流率达到极限水平。而且,随着凝胶层的不断增厚,原先能透过膜的小分子溶质和溶剂也受阻碍,流率越来越慢,最后降到最低点。反之,比重较小的球形分子较易扩散,在一定压力下虽也形成浓度梯度,但不易形成凝胶层,随着压力的增加,流率也有相应提高。

2. 溶质浓度 溶液浓度对流率有影响是很易理解的。在一定压力下,稀溶液比浓溶液的流率高得多,故一般稀溶液浓缩至一定浓度时流率逐渐下降。用补充溶液来稀释的办法,可以减少浓度极化,增高流率,但却延长了过滤时间。如用于大分子脱盐,可在超滤器和压力源之间加贮存瓶,内装的新的洗涤液不断补充到超滤器内(流率与超滤器流率相等),于是超滤器内大分子溶质浓度不变,而小分子溶质和盐类不断被洗涤液洗出,最后可将小分子溶质和盐类脱尽。此法已称透滤或加压透析,如图 7-36。用此法脱盐十分有效。

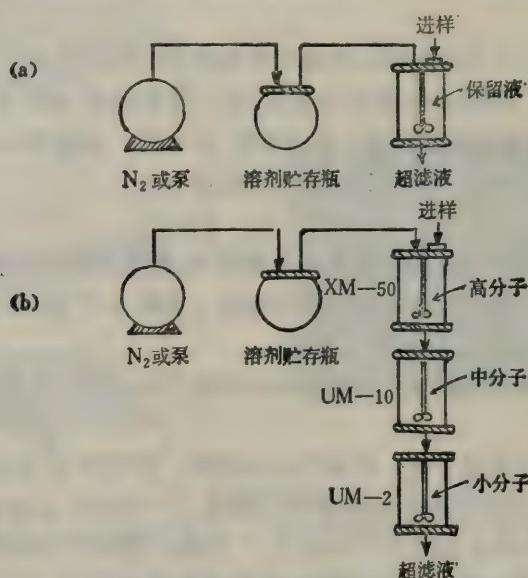


图 7-36 透滤装置示意图

3. 压力 对于具有高度扩散性的溶质分子和较稀的溶液,增压能增加流率。但增压也常加速浓度极化,故开始增压时流率增加较快,当压力增至一定程度时,流率增加便减慢,二者并不成比例。对于易生成凝胶的溶质,一旦形成凝胶层,增压对流率就不再起作用。因此,对不同溶质,应选择不同的操作压力。

4. 搅拌 搅拌可以破坏溶质在膜表面形成的浓度梯度,即加快溶质分子的扩散,减少浓度极化,从而提高流率。如同时增压,可大大提高流率。对于易形成凝胶层的溶质,效果更显著。对搅拌产生的切力较敏感的大分子(如酶和核酸),必须注意控制搅拌速度,以免破坏它们的活性。采用单程传送的浅道系统的超滤方法,有时能避免这种不良影

响。

5. 温度 通常升高温度可以降低溶液粘度及减少凝胶的形成。温度升高，溶质溶解度通常也增加。故升温可提高流率，但温度过高易使活性大分子变性。所以考虑升温提高流率时，对不同的溶质需严格地区别对待。

6. 其它 溶液 pH、离子强度及溶剂性质等因素对流率均有影响。可以认为，凡能增加溶质溶解度或减少溶质形成凝胶倾向的因素都能增加超滤的流率。

(五) 超滤的应用

1. 乳清的回收 乳清是用牛奶生产干酪和酪蛋白过程中酪蛋白凝固收获后留下的残液。它含有牛奶中 70% 左右的营养成份（包括 20% 蛋白质，极为丰富的乳糖、维生素及矿物质），过去往往作为废水弃去。七十年代初，全世界每年约产生乳清 500 亿磅。因此，乳清的回收不仅有重大经济意义，而且涉及环保问题。采用超滤法后，乳清处理有很大改进。如图 3-37 所示，采用一级超滤一级反渗透装置，每天可处理乳清二千加仑，分别将蛋白质及乳糖浓缩回收，除去约 90% 水份^[28,29]。

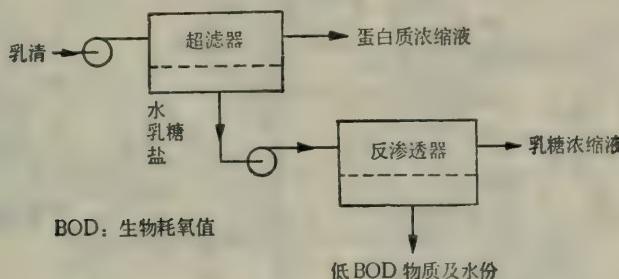


图 7-37 乳清处理膜分离法示意图

2. 生物大分子浓缩和脱盐 酶、蛋白质、核酸、多糖等用超滤法浓缩的报道日益增加，^[30-32] 其中较多用于酶类。酶的回收率可高达 90%^[33]。同时可除去盐和低分子杂质，比活力有较大提高，是简单、高效、经济、快速的浓缩法。Wang, D. I. C. 等人在 1970 年报告了使用 UM-10 膜浓缩及回收几种酶的情况^[34] 见表 7-9。

表 7-9 几种酶 UM-10 膜超滤浓缩及回收率

酶的名称	开始体积 (毫升)	最后体积 (毫升)	体积浓缩 倍数	酶浓度 (单位/毫升)			回收率 ⁽¹⁾ (%)
				原样品	浓缩液	滤液	
青霉素酶	1800	150	12.3	100	950	0	29.3
β -半乳糖苷酶	1000	33	30.3	0.75	5.44	0	24 ⁽²⁾
胰蛋白酶 ⁽³⁾	1400	310	4.52	4.5	18.7	0	91.3
胰蛋白酶	1320	290	4.56	4.3	14.9	0	76.6

$$(1) \text{ 回收率} = \frac{\text{浓缩液总酶活}}{\text{原样品总酶活}} \times 100$$

(2) 对照样品中 47% 半乳糖苷酶活性因放置过久受到损失，故此值不准确。

(3) 此酶在 11°C 下过滤，其它三种酶在 25—26°C 过滤。

此外，也有人用超滤法浓缩病毒、多糖，从尿中回收蛋白质激素^[29,35]。用超滤法浓缩地衣芽孢杆菌 2709 碱性蛋白酶时，酶活力损失少(<5%)，浓缩倍数高，节约能源，设备简单，还能同时除去低分子杂质和部份色素^[40]。

3. 大分子溶质的分级分离与提纯 蛋白质、酶等大分子用一次超滤法很难达到分离纯化的目的，需用 2—3 级超滤装置，才能收效。串联超滤装置是根据截留不同大小的分子来区分的。第一级装置选用的膜分子量截留值大于第二级，第二级用的膜分子量截留值大于第三级，其余依此类推。然后用色谱分析法测定各级超滤装置的滤出液及保留液中的成份，即可知各级的分离效果及组份的纯度^[36,37]。图 7-38 是牛乳乳清通过二种不同超滤串联装置(搅拌型和浅道型)分级分离的色谱分析示意图^[38]。

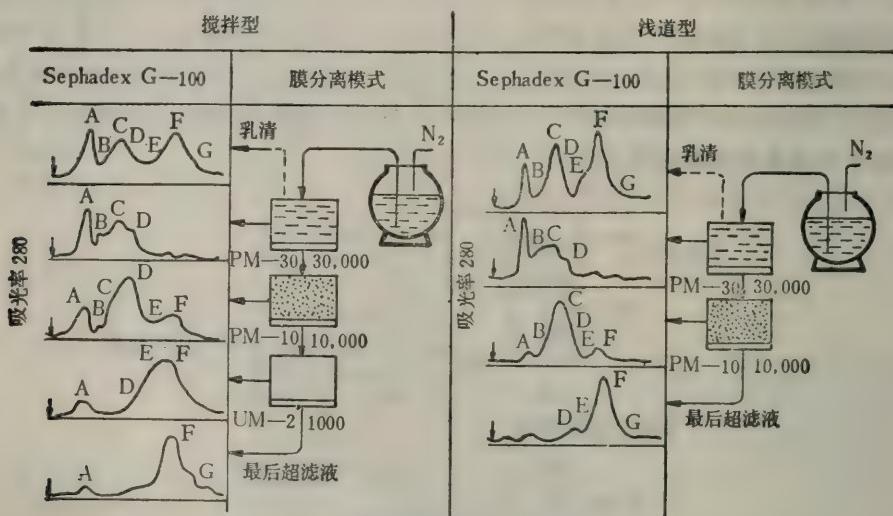


图 7-38 牛乳乳清用二种超滤装置分级分离示意图

表 7-10 二种串联超滤装置对牛乳乳清分离的产量比较

额定膜间隔分子量范围	蛋白 质 产 量	
	实际产量 (%)	理论产量 (%)
搅拌系统 730,000	50.3	17.6
10,000—30,000	2.4	38.1
2,000—10,000	5.7	4.1
<2,000	41.5	40.1
浅道系统 >30,000	24.7	13.2
10,000—30,000	32.8	41.5
<10,000	42.5	45.2

Blatt, W. F. 比较了二种超滤串联装置对牛乳乳清分离的理论和实际产量，见表 7-10。

从上表可看出，搅拌系统超滤中各级分离所得实际产量与理论值相差较大，而在浅道

系统中,所得数据都比较接近理论值。采用浅道系统型串联装置分部分离的效果较好。

4. 超滤分离与酶反应器(或发酵)联用 把超滤分离与酶反应器联用多见于酶促分解反应。将大分子底物变成小分子产物后,被超滤除去,保留下来的酶分子和底物返回反应器再行反应,连续除去底物。反复进行反应,结果大大提高底物利用率,减少酶用量和增加酶反应速度。超滤分离与酶反应器联用装置见示意图 7-39^[39]。这类装置已广泛用于纤维素糖化、蛋白酶对蛋白质的水解、淀粉酶对淀粉的水解^[30]、以及大豆酶解产物的分离等^[41]。

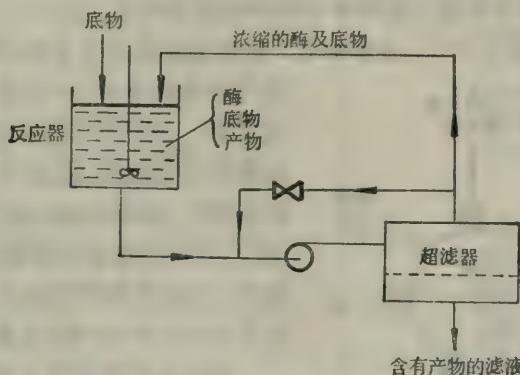


图 7-39 超滤分离与酶反应器联用装置简图

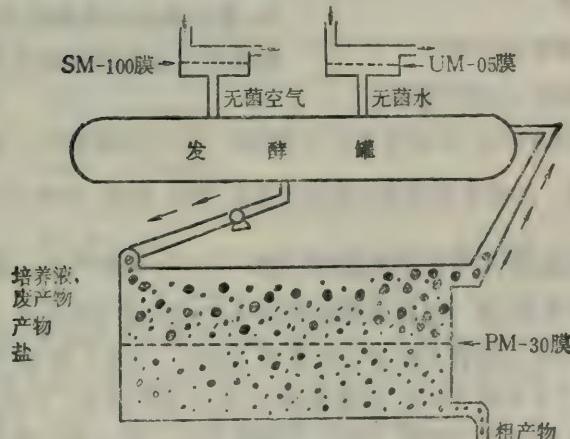


图 7-40 超滤分离与发酵罐联用装置简图

同理,超滤与发酵联用,见图 7-40,可以使超滤回收的营养物继续供给细菌利用,而产物及有毒物不断滤去,以减少对微生物的抑制。微生物分泌至胞外的大分子产物在超滤时被截留还是透过膜,主要决定于对膜的选择。如果超滤时营养物的损失过多,还需适当补充,以维持微生物正常生长环境。

Sonoyma 和 Wang^[34, 42] 利用超滤与发酵联用装置连续培养溶组织梭菌,使蛋白酶分泌至胞外,然后用 Abcor 的 HFA-300 膜分离,除去有毒代谢物,结果酶和菌体的产量都高于常规方法。

此外,用吸附、交联、共价键合等方法可将各种酶做成单酶膜或多酶膜,已大量用于生化分析及食品医药工业^[43]。

三、电渗析和离子交换膜电渗析^[40]

(一) 电渗析

是在半透膜两侧加电极使可透过膜的带电物质彼此分开的方法。可用于大分子溶液脱盐纯化。此法常因电流作用产生大量的热，需要附加冷却装置才能保证透析正常进行。此外，通电时产生电渗流（即外加电场使带电粒子与介质作相对移动），也常对膜分离带来不良影响。因此，电渗析在生化分离制备上不如超滤那样受欢迎。

电渗析基本装置如图 7-41^[1]，容器中有二块半透膜隔成三个室，中心室放试液，两侧

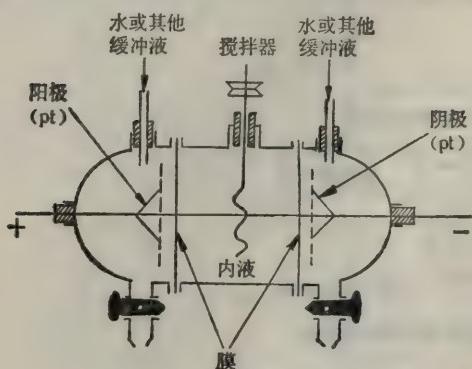


图 7-41 电渗析基本装置图

室内装纯净溶剂（一般为水），并分别插入正负电极。通电后，中心室内试液的阳离子透过膜移向阴极槽，阴离子则移向阳极槽。透析开始时，因中心室内离子浓度大，可用较低电压，当中心室离子浓度很低时，可适当升高电压，以缩短透析时间。实验室电渗析常用电压为 200—300 伏，电流为 50 毫安左右。

用电渗析法也可分离一些带有电荷的生物大分子，如蛋白质和核酸等。但具体操作时，需经凝胶电泳将样品初步分开后，再通过电渗析方法使所需组份与凝胶分离。现举电

渗析法分离质粒 DNA 一例于后^[48]：

E. coli 8021 (pBR322) 加氯霉素扩大培养后，离心收集菌体。用终浓度为 2% 重结晶 SDS 使菌体裂解。加等体积苯酚（水饱和并用 Tris 调至 pH8.0）及 $\frac{1}{2}$ 体积氯仿-异戊醇 (24:1) 提取两次，再用等体积氯仿-异戊醇 (24:1) 提取两次。在水相中加入 $\frac{1}{10}$ 体积 NaAc (2M, pH 5.0) 及二倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA。使用直径为 1.4 厘米的电泳管进行制备电泳，每管上样量 200 微克 DNA，以溴乙锭为 DNA 定位指示剂。电泳后切取发荧光的含质粒 DNA 的凝胶薄片，放入透析袋中，在冰浴中电渗析 3 小时，电流 0.07 安培，在电场作用下质粒 DNA 与凝胶分开，进入透析袋内的溶液中，吸出含 pBR322 DNA 的溶液即为成品。

(二) 离子交换膜电渗析

离子交换膜电渗析器主要由离子交换膜隔板，电极及电渗析池和外接直流电源组成。其中离子交换膜最为重要，它可以选择透过或阻留不同的离子。离子交换膜的选择透性一方面决定于膜表面的孔隙度大小，只让小于膜上孔隙的物质通过，大于膜上的孔隙的物质被阻留。另一方面，也决定于组成膜的离子基团，它们在强电场作用下对某种离子所起的吸附或排斥作用，能够达到选择分离的目的。如带磺酸基团的阳膜，在电场中电离为带负电的 $R-SO_3^-$ ，它吸引和让阳离子通过，而对阴离子则起排斥作用。同样，带有季胺基团的阴膜，在电场中电离为带正电荷的 $R-N^+(NH_3)_3$ ，它只吸引和让阴离子通过，而对阳

表 7-11 国外离子交换膜电渗析应用简况

类 别	试 验 中	工 业 化
脱 盐	高纯水 蛋白质精制 糖类脱盐 液晶脱盐 人工肾膜	海(咸)水淡化 放射性废液处理 血清脱硫酸铵 牛乳乳清脱盐 氨基酸脱盐 干酪素制造
	同位素分离 铼、钯、金、钴分离 苯与环己烷分离 电镀液回收 显影剂废液回收 造纸废液回收 氢氟酸分离	海水浓缩 纸浆黑液处理 电镀废液中 Ni 和 H ₂ SO ₄ 回收 人造丝粘性废液回收 酸的回收
	感光乳剂处理 磷酸纯化	果汁脱酸改性 无机和有机药品制备
	醋酸钠电解 硫酸钠电解 脂肪族氧化生成单烷基酸和醚 甲基丙烯酸聚合 铝渣回收	食盐电解 丙烯腈电解还原 Zn-Ni 合金电镀 Fe 还原
	酸碱制备	
复 分 解	2NaCl + Ca(OH) ₂ = 2NaOH + CaCl ₂ 2NaCl + (NH ₄) ₂ CO ₃ = Na ₂ CO ₃ + NH ₄ Cl	
	同价离子分离	电泳涂漆
电 泳		

离子起排斥作用。现以淡化海水时氯化钠的电渗析为例,说明电渗析原理:如图 7-42 所示,许多阴膜和阳膜交替排列组成多槽电渗析池,在直流电场作用下,Na⁺ 趋向阴极并与阳膜上 H⁺ 交换而选择性地透过阳膜,但被阴膜所阻而留于有*符号的浓缩室中;Cl⁻ 趋向阳极并与阴膜上 OH⁻ 交换而选择性地透过阴膜,但被阳膜阻留于有*符号的浓缩室中。于是在有△符号的淡化室中,由于溶液中 NaCl 含量减少而变淡,而浓缩室中海水因 NaCl 含量增加而变为浓盐水。各室中淡水,浓盐水分别由不同管道排出,就达到咸水淡化和浓盐水用于制盐的目的。实际操作时还应附加预处理设备,淡水再除盐装置及浓盐水再循环处理等。

离子交换膜电渗析主要用于海水淡化与制盐,工业上脱盐浓缩。在生化方面也常用于蔗糖、柠檬酸和抗菌素等的分离提纯,注射用水的制备,蛋白质与氨基酸的脱盐等^[44,45]。

六十年代后,离子交换膜电渗析用的膜及各种电渗析器装置日新月异。如日本德山曹达公司生产的离子交换膜就将近十四种,美国 AMF 公司、杜邦公司、英国的 Permuti 公司等也生产多种型号的离子交换膜。目前离子交换膜的品种繁多,根据膜上所带活性基团可分为阳膜和阴膜二大类型。近来按照不同的分离目的还发展了许多不同性能的离

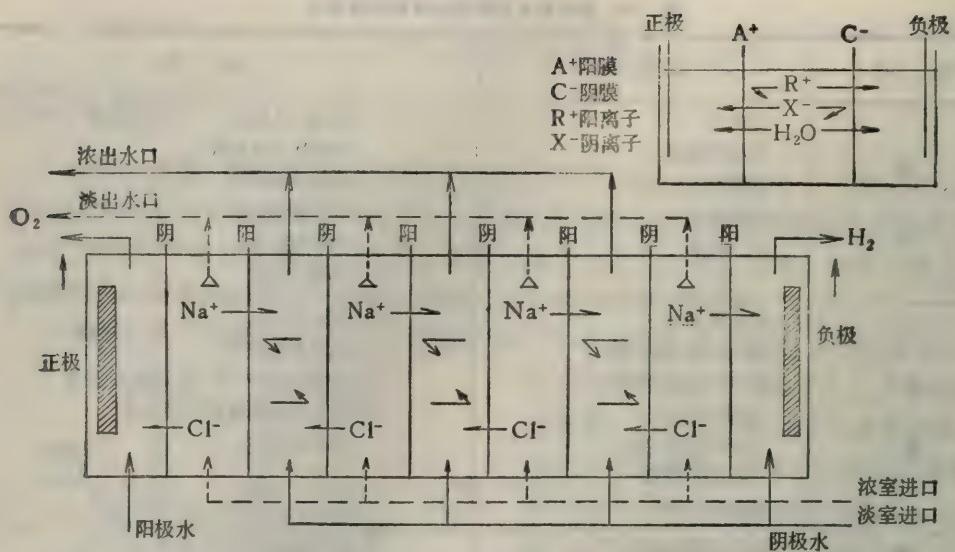


图 7-42 海水淡化离子交换膜电渗析示意图

子交换膜,如磷酸-羧酸螯合型膜,吡啶季胺-羧酸两性膜,用于压渗(是一种渗析和反渗析相结合的新技术)的镶嵌型膜,以及无机离子交换膜等。

离子交换膜电渗析在国外的应用情况见表 7-11^[46],近年来,国内离子交换膜的研制及电渗析的应用,也发展较快,如上海化工行业已生产多种异相膜、半均相膜及均相膜,用于海水淡化,污水处理,综合回收等试验。在生化分离制备方面,上海酵母厂用电渗析法从柠檬酸发酵液分离提纯柠檬酸,1977 年经鉴定认为可以投产^[47]。

参 考 文 献

- [1] 阿南功一等编:基础生化学实验法 2,抽出·分离·精制,丸善株式会社(1974)
- [2] A. R. 别尔林著:有机化学实验操作技术,化学工业出版社(1952)
- [3] 韩广甸、赵树纬、李述文等编译:有机制备化学手册(上册),石油化学工业出版社(1977)
- [4] 广东化工学院工业发酵专业委员会编:工业微生物生产过程设备(上册)(1976),内部教材
- [5] Graham, T. Trans. Roy. Soc. Lond., 151, 183 (1886)
- [6] Craig, L. C. and King, T. P., J. Am. Soc., 77, 6620 (1955)
- [7] Craig, L. C. and Konigsberg, W., J. Phys. Chem., 65, 166 (1961)
- [8] Craig, L. C., Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. 2, 119, Academic Press, New York (1968)
- [9] Mcphie, P., Methods in Enzymology, Vol. 22, 23 (1971)
- [10] 潘家秀等编著:蛋白质化学研究技术,1—2页,科学出版社(1962)
- [11] 江苏新医学院:生物化学与生物物理进展,第2期,38页(1976)
- [12] Feinstein, R. N., J. Lab. Clin. Med., 40, 313 (1952)
- [13] Katz, S. and Walls, H. A., Analyt. Biochem., 23, 1 (1968)
- [14] Hospethom, V. D., Analyt. Biochem., 2, 180 (1961)
- [15] 第一轻工业部发酵研究所:微生物简报,第二期,1~20页(1970),内部资料
- [16] Keitz, A. H. and Riley, W. H., Analyt. Biochem., 36, 535 (1970)
- [17] Craig, L. C. and Stewart, K., Biochemistry, 4, (12), 2712 (1965)
- [18] Zeineh, R. A., Pillay, V. K. J., Smith, E. C. et al., J. Lab. Clin. Med., 79, 684 (1972)

- [19] 吴琼发: 微生物学通报, 第4期, 35页(1979)
- [20] 中国科学院上海生物化学研究所三室: 生物化学与生物物理进展, 第2期, 36页(1975)
- [21] Blatt, W. F., *Methods in Enzymology*, Vol. 22, 39 (1971)
- [22] Blatt, W. F. *Membrane Separation Process* (Ed. Meares, P.), p. 81, Elsevier Scientific Publishing Co., New York (1976)
- [23] Porter, M. C. and Nelson, L., *Recent Developments in Separation Science* (Ed. Norman, N. Li. Sc. D.), Vol. 2, 227, The Chemical Rubber Co. Press (1972)
- [24] 中国科学院北京植物研究所: 生物化学与生物物理进展, 第2期, 29页(1975)
- [25] Van Oss, C. J., McConnell, C. R., Tompkins, R. K. and Bronson, P. M., *Clin. Chem.*, 15, 699 (1969)
- [26] Edberg, S. C., Bronsen, P. M. and Van Oss, C. J., *Prep. Biochem.*, 12, 49 (1971)
- [27] Van Oss, C. J. and Bronson, P. M., *Separation Sci.*, 5, 63 (1970)
- [28] Anon., *Environ. Sci. Technol.*, 5, 396 (1971)
- [29] Nielsen, I. K., *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 3, 115 (1972)
- [30] Porter, M. C., *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 3, 115 (1972)
- [31] Niлем, I. K., Bundgard, A. G. et al., *Process Biochem.*, 7(9), 17(1972)
- [32] Baker, R. W. and Strathmann, H., *J. Appl. Polym. Sci.*, 14, 1197 (1970)
- [33] Wang, D. I. C., Sinskey, A. J. and Sonoyama, T., *Biotechnol. Bioeng.*, 11, 987 (1969)
- [34] Wang, D. I. C., Sinskey, A. J. and Butterworth, T. A., *Membrane Science and Technology*, (Ed. Flinn, J. E.), Plenum Press, N. Y. (1970)
- [35] Guskey, L. E. and Woff, D. A., *Appl. Microbiol.*, 24, 13 (1972)
- [36] Blatt, W. F. et al., *Anal. Biochem.*, 18, 81(1961)
- [37] Michaels, A. S., *Chem. Eng. Progr.*, 64(12), 31(1969)
- [38] Blatt, W. F., *J. Agr. Food Chem.*, 19, 593 (1971)
- [39] Sammon, D. C., *Membrane Separation Process* (Ed. Meares, P.), p. 252, Elsevier Scientific Publishing Co., N. Y. (1976)
- [40] 《微生物工程》编写组: 微生物工程(下册), 285, 上海科技出版社(1982)
- [41] Wang, D. I. C. et al., *Chem. Eng.*, 76(27), 108 (1969)
- [42] Sonoyama, T., Recovery of products from fermentation process by ultrafiltration, M. S. Thesis, M. I. I., (1968). in "Recent Developments in Separation Science" (Ed. Norman, N. Li. Sc. D.) Vol. II, 227, Chemical Rubber Co. Press (1972)
- [43] Thomas, D. and Caplan, S. R., *Membrane Separation Process* (Ed. Meares, P.), p. 351, Elsevier Scientific Publishing Co., N. Y. (1976)
- [44] 上海医药工业研究院: 医药工业, 第一期, 16页(1971); 第二期, 25页(1971)
- [45] 上海医药工业研究院: 医药工业, 第四期, 15页(1972)
- [46] 上海医药工业研究院编印: 离子交换膜的新进展(1975), 内部资料
- [47] 全国工业微生物科技情报站编: 工业微生物, 第一期, 14页(1978)
- [48] 周和山等: 第四次中国生化学术会议论文摘要汇编, 98页(1982)
- [49] *Biomedical Products*, Vol. 7, No. 3, p. 31 (1982)

第八章 结晶方法

苏 拔 贤

第一节 结晶与晶体一般性质

结晶是物质从液态或气态形成晶体的过程，但在生物化学领域中，绝大多数的物质的结晶，都是从液态通过一定条件形成晶态的。结晶是物质分离纯化的一个古老而目前还十分常用的手段，它普遍应用于各种化学制备工艺中，制备结晶物也常作为结构分析之用。

按照一般结晶化学原理^[1]，一个结晶应是具有一定形状的固态物质，这种固态物质由许多性质相同的粒子（包括原子、离子和分子）有规律地排列而成。但某些物质如玻璃和树脂，外观很像晶态固体，实际上是熔体过冷而成的无定形物质，只因粘性很大不易变形。某些液体乍看起来不像晶体，但内部结构明显地具有晶体空间排列规律性，如某些棒状大分子晶体受热转为液体，或生物大分子中所结合的水层都具有此种规律性，这种液体称为液态晶体或简称液晶。液晶是物质一种特殊状态，即在一定温度内既具有液体的特性，同时又具有晶体特性的物质。

物质属于晶态或非晶态，主要区别是晶态物质的许多性质（如电学和光学等性质）都具有方向性，即一个晶体在同一方向上具有相同的性质，在不同方向上具相异性质，称为晶体各向相异性，非晶体则不具此性质。其次是晶态物质具有一定对称性。晶体外形对称性也是晶体内部规律性的反映。晶体外形结构的几何规律性可以归纳成许多对称类型。晶体上述这些特性都是由于组成晶体的粒子排列具有空间点阵的周期性所引起的。所谓空间点阵学说，简单地说，就是把构成晶体内部粒子的排列，形象地比喻为一盘摆在三维空间排列的“围棋子”，而点阵中每一个点子（也称结点），便代表着一个粒子或粒子集团的重心，而整个晶体结构即由每个结点沿着空间不同方向，并按一定距离周期性地

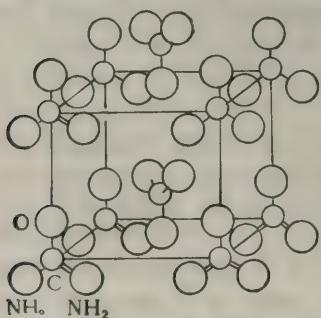


图 8-1 尿素晶胞示意图
法测定并计算求出。

平移而成。每一平移距离称为周期，不同方向周期不同，而每个结点周围环境条件是相同的。空间点阵学说的建立，使晶体许多性质得到了合理的解释。因此，晶体的现代定义是：许多性质相同的粒子在三维空间有规律地排列成格子状固体，称为晶体。围绕晶体的天然平面称为晶面，二个晶面的交线称为晶棱。而晶体中每个格子称为晶胞。图 8-1 是尿素晶体中一个晶胞，它含有九个分子。一个晶体内的晶胞之大小，所含原子或分子数目及其分布规律，可通过 X 射线衍射方

晶体内部有规律的结构，规定了晶体的形成必须是相同的离子或分子，才可能按一定距离周期性地定向排列而成。所以能形成晶体的物质是比较纯的。在生化制备中，许多

小分子物质如各种有机酸、单糖、核苷酸、氨基酸、维生素、辅酶等，由于其结构比较简单，分离至一定纯度后，绝大部分都可以定向聚合形成分子型或离子型的晶体。至于如多糖、蛋白质、酶和核酸等生物大分子，由于分子量大，结构复杂，不易定向聚集，获得结晶就相对困难得多。但生物大分子都是由相同或相似的小分子“单体”缩合而成，如蛋白质和酶由二十种 α -氨基酸通过肽键组成，多糖类由一种或数种单糖通过糖苷键组成，两大类核酸由四种核苷酸通过磷酸二酯键连接而成。因此，生物大分子也具有形成晶体的能力，但这种能力和大分子结构和外形有很大关系。一般来说，分子支链较少、对称的比支链多、不对称的分子容易结晶，分子量越大越难结晶，分子量小，易结晶。例如大多数球蛋白和酶蛋白比较容易结晶，一些大小均匀的病毒特别是植物球状病毒，也比较容易得到结晶，高度不对称的核酸大分子，与蛋白质相比则较难结晶。（在一定条件下，小心操作，也可以获得一定结晶度的固体。）还有一些结构复杂，不对称的核酸、蛋白质和多糖类，迄今仍未能获得晶体。

大多数物质结晶都是在溶液中进行，故晶格中常含有一定结晶水。无机化合物所含结晶水的量常在分子式后予以标明，如蓝矾写作 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ，为硫酸铜的五水化合物。有机化合物及生物大分子的晶体也含有结晶水，如许多蛋白质和酶的结晶水含量常达 10—50%。 β -乳球蛋白、麻仁蛋白、溶菌酶的晶体水份分别占晶体重量 46%，39.2% 和 48%，而原肌球蛋白的长角片晶中水竟占总重 90%，可见水在蛋白质晶体中占的比重相当大。晶体的水含量与晶体蒸汽压强有关，当晶体蒸汽压强高于大气蒸汽压强时，则风化失去结晶水，当晶体蒸汽压强低于周围大气压强时，则晶体吸收空气中的水分而潮解。所以一定的水份对维持晶体的结构是十分重要的。

鉴定物质的晶态与非晶态，通常在光学显微镜或偏光显微镜下观察其形状、大小和消光现象；或者进一步用 X 射线衍射方法加以分析鉴定。

第二节 生化物质形成结晶的条件^[2,3,4]

物质能不能结晶主要决定于物质的本性，但具有一定结晶能力的物质进行结晶时还必须在一定的条件下才能形成结晶，各种生化物质形成结晶时，往往要求一定样品的纯度，溶液的饱和度和溶剂的性质等三个主要条件，其中纯度和溶液饱和度是决定因素。

一、样品纯度

所谓纯度是指所需要的组分与不需要的杂质所占的比例。杂质占比例越低，则所制备物质的纯度越高。物质欲在溶液中析出结晶不论是小分子或大分子均需达到一定纯度才能发生。但究竟纯化到什么程度才能结晶，则依各种物质而异，没有一定的标准。有些样品虽然纯度很不高，欲条件合适，也可以从混合液中单独析出结晶（如毛发水解液中结晶胱氨酸）。对于大多数的蛋白质来说，一般要求纯度常常达 50% 以上才进行结晶。样品的纯度对结晶的影响是由于结晶过程具有高度选择的缘故。杂质的存在，有的影响待结晶溶质在晶面上的定向排列，使结晶无法进行或进行得很慢，阻碍晶核的形成，有些杂质还能与结晶溶质化合或结合成络合物。所以在结晶前总是设法通过各种分离纯化手段，

使样品达到一定纯度后才进行结晶。

有时候某些杂质吸附在晶体表面,只影响晶体色泽,而不妨碍晶体的形成,这时可加少量(一般为1—2%)的活性炭、硅藻土、活性白土等,利用有色杂质一般具有较多双键与发色基团,容易被这些脱色剂吸附的特点,进行有选择地吸附再通过离心过滤方法除去杂质后仍可以获得良好的结晶。但使用以上吸附剂时必须防止这些吸附剂同时对样品的吸附。

二、溶液的饱和度

结晶形成的条件最主要的是建立在溶解度改变的基础上,因此找到了合适的浓度,结晶物的分子或离子便有足够的相碰机会,并按一定速率作定向排列聚集而形成晶体。浓度太高到达饱和状态时,结晶物的分子在溶液中聚集析出的速度太快,超过这些分子形成晶核的速率,便得不到晶体,只获得一些无定形固体微粒,或虽得到一些结晶,但共沉物(或杂质)含量很高。相反浓度太低,样品溶液处于不饱和状态,结晶形成的速率远低于晶体溶解的速率,也不能得到结晶。因此只有在稍稍过饱和的状态(或称低过饱和状态)下,即形成结晶速率稍大于结晶溶解速率的情况下才能获得晶体。结晶的大小和均匀度和结晶的饱和度有很大的关系,获得良好的结晶一般常控制在饱和区以上、过饱和区以下的稳定区范围内(见图8-2)。此时,晶体附近的溶液浓度接近于饱和状态,而较外层的溶液为过饱和状态,利用这种浓度差使外层待结晶的溶质向晶体周围扩散,最后定向地沉积于晶体表面上,使结晶逐渐长大。所以,结晶开始时,应使溶液处于稍稍过饱和状态以利于晶粒形成;然后控制在稳定区范围内,这时形成新的晶核较少,主要使已形成的结晶长大,便可获得较大的和均匀的结晶。

在过饱和区是新晶核大量形成的浓集区,晶核形成以后没有一个稳定的使晶体长大的所谓“养晶区”,于是只得到一些颗粒很小又不均匀的晶体。过饱和度的大小与晶核生成的速度关系见图8-3,在图中可以看到,过饱和越大,晶核生成速度越快,形成结晶的颗粒愈小。晶粒过小不仅影响分离过滤上的困难,而且造成结晶产率和质量下降。如在味精(谷氨酸钠)的结晶过程中,常保持溶液在64~65°C左右,浓度在波美31.5~32度,结晶成长刚好在稳定区。浓度过高时,结晶液发生混浊现象,表示新的晶核大量形成,此时

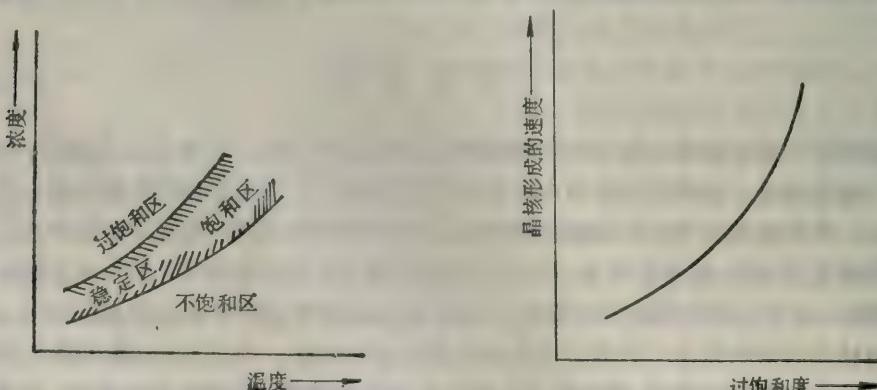


图8-2 晶体形成的浓度区域图

图8-3 晶核形成速度和过饱和度关系示意图

必须用热的蒸溜水调节，消除混浊现象，保持溶液在稳定区的浓度，方能获得较大整齐的结晶。

在晶核形成时，如何控制结晶液刚好在低过饱和度状态？在工业大规模生产时，常将结晶溶液浓缩至一定程度，或加入各种沉淀剂（盐或有机溶剂），至溶液出现乳白色混浊，即认为低过饱和度已到，而放置结晶。这种粗略估计方法，对于制备一般试剂药品用的生化分子的结晶，已可满足要求，但对于制备一些供X射线结构分析用的大结晶（须大于0.1 mm 直径）。按常规方程，当样品发生混浊时，实际已超过最低的过饱和度，此时很难取得较大的晶体，必须小心地测出样品的溶解度曲线，然后从中求出最低的过饱和度；^[5] 或者通过十分缓慢的蒸发和扩散作用，使结晶液达到低过饱和度后，并保持溶液的稳定浓度，才可获得较大的单晶体。关于以蛋白质为对象的一些微量结晶方法本章后面还将进一步讨论。

三、溶剂的选择

溶剂对于晶体能否形成和晶体质量的影响十分显著，故找出合适的溶剂是结晶实验首先考虑的问题，一个物质的结晶究竟选用什么溶剂合适？需要对此物质某些性质如溶解度、稳定性及温度系数等进行预试验才能确定。对于大多数生化小分子来说，水、乙醇、甲醇、丙酮、氯仿、乙酸乙酯、异丙醇、丁醇、乙醚、N-甲基甲酰胺等溶剂使用较多。尤其是乙醇，既具亲水性，又具亲脂性，而且价格便宜、安全无毒，所以应用得最广。至于蛋白质、酶和核酸等大分子使用较多的是硫酸铵溶液、氯化钠溶液、磷酸缓冲液、Tris 缓冲液和丙酮、乙醇等。有时某单一溶剂不能促使样品进行结晶，则需考虑使用混合溶剂（但这两种溶剂应能相互混合）。操作时先将样品用溶解度较大的溶剂溶解，再缓慢地分次少量加入对样品溶解度小的溶剂，直至产生混浊为止，然后放置或冷却即可获得结晶。也可选用在低沸点溶剂中易溶解，在高沸点溶剂中难溶解的高低沸点二种混合溶剂。当结晶液放置一段时间，低沸点溶剂由于慢慢蒸发掉而使结晶形成。许多生物小分子结晶使用的混合溶剂有水—乙醇，醇—醚，水—丙酮，石油醚—丙酮等。

选择结晶溶剂常注意如下几个条件：

- (1) 所用溶剂不能和结晶物质发生任何化学反应。
- (2) 选用的溶剂应对结晶物质有较高的温度系数，以便利用温度的变化达到结晶的目的。
- (3) 选用的溶剂应对杂质有较大的溶解度，或在不同的温度下结晶物质与杂质在溶剂中应有溶解度的差别。

(4) 所用溶剂如为易挥发的有机溶剂时，应考虑操作方便，安全。工业生产上还考虑及成本高低，是否容易回收等。

当然以上条件并不是对每一种物质都是符合的。事物的矛盾总有主次之分，对于未知物的结晶，溶剂的选择主要为了能获得结晶，重结晶时才考虑溶剂其他方面的性能。对于具有生理活性的生物大分子，溶剂对分子活性的影响（即生物大分子的稳定性）常是最先考虑的问题，一般选用温和的条件下缓慢地结晶以及反复多次地进行重结晶，而不宜使用强烈的条件。

第三节 晶核形成及晶体生长的影响因素

一、晶核的形成及诱导方法

晶核的形成一般方法是将饱和溶剂冷却、蒸发除去部分溶剂或者加入沉淀剂等，使溶液达到过饱和状态，则其中过饱和部分的溶质便渐渐析出晶核。如只由溶质分子（或离子）自身定向聚集形成的晶核，叫作“同相结晶化”，这在低过饱和的样品溶液中很难发生，需要较高过饱和度或放置较长时间才能产生结晶核，故在工业生产及实验常规结晶时，通常待溶液达到稍过饱和状态后，加入同种晶核，或某些异种固体微粒，使形成二相交界面诱导晶核的形成，这叫作“异相结晶化”。在异相结晶化中加晶种诱导结晶方法是最常用的方法，此法如掌握适当，不仅缩短结晶时间，而且所得的晶体较大而且均匀整齐。

添加晶种诱导晶核形成的常用方法大致如下^[6]：

(1) 如有现成晶体，可取少量研碎后，加入少量溶剂，离心除去大的颗粒，再稀释至一定浓度（稍稍过饱和），使悬浮液中具有很多小的晶核，然后倒进待结晶的溶液中，用玻璃棒轻轻搅拌，放置一段时间后即有结晶析出。

(2) 如果没有现成的晶体，可取1—2滴待结晶溶液置表面玻璃皿上，缓慢蒸发除去溶剂，可获得少量晶体。或者取少量待结晶溶液置于一试管中，旋转试管使溶液在管壁上形成薄膜，使溶剂蒸发至一定程度后，冷却试管，管壁上即可形成一层结晶。在玻璃皿或试管壁上的结晶，用玻璃棒刮下沾取少量接种到待结晶溶液中，轻轻搅拌，并放置一定时间，即有结晶的形成。

对以光学异构体进行诱导结晶时，加入的晶种须根据分离晶体性质而定。如加入光学性质相同的晶体，便优先诱导形成同种异构物的结晶。

此外，有些蛋白质和酶结晶时，常要求加入某种金属离子才能形成晶核。如锌胰岛素和镉铁蛋白的结晶。它们结合的金属离子便是形成晶核时必不可少的成份。

实验室结晶操作时，人们较喜欢使用玻璃棒轻轻刮擦玻璃容器的内壁，刮擦时产生玻璃微粒可作为异种的晶核。另玻璃棒沾有溶液后暴露于空气部分，很易蒸发形成一层薄薄的结晶，再浸入溶液中便成为同种晶核。同时用玻璃边刮擦边缓慢地搅动也可以帮助溶质分子在晶核上定向排列，促成晶体的生长。

最后应该指出，对加入固体微粒诱导形成晶核的方法，需看结晶物质的用途而有选择地使用。如要求纯度很高或用X射线衍射结构分析的晶体，结晶时异种晶体、玻璃微粒、尘埃、气泡、变性生物大分子均应尽量除去。制得的晶体的纯度才合乎要求。

二、影响结晶生成的因素

结晶的生成除与溶液饱和度和溶剂性质等因素直接有关外，还受下列因素的影响：

(一) 温度

温度对溶解度的影响是人们所熟知的，许多物质在温度升高时，溶解度升高，温度降

低时，溶解度也随之减少，但也有例外。故许多耐热小分子物质一般采用高温溶解，缓慢冷却结晶的方法。冷却的速度及冷却的温度直接影响结晶效果，冷却太快引起溶液突然过饱和，易形成大量结晶微粒，甚至形成无定形沉淀。冷却的温度太低，溶液粘度增加，也会干扰分子定向排列，不利于结晶的形成。温度不同，同一物质其结晶形态及结晶大小，质量也有很大差别。

利用温度差方法对生物大分子进行结晶时，更需注意掌握结晶的条件，各种蛋白质的结晶对温度要求有很大的不同，如触珠蛋白在高盐浓度下常需要比室温稍高的温度才能结晶，而血清清蛋白则需较低温度下长期存放才能结晶^[8]。所以很多生化大分子结晶时利用温度变化的方法，很难在理论上划定标准，只能根据实践而定，不同于一些有机小分子物质。生物大分子整个分离纯化过程，包括结晶在内，通常要求在低温或不太高温度下进行。低温有利于保护生物活性，尤其是使用有机溶剂进行结晶时，要求温度更低。否则由于有机溶剂作用引起蛋白质变性就无法形成结晶。

(二) pH

pH 值的变化，可以改变溶质分子的带电性质，是影响溶质分子溶解度的一个重要因素。在一般情况下，结晶溶液所选用的 pH 值与沉淀大致相同。蛋白质、酶等大分子结晶的 pH 多选在该分子的等电点附近。如果结晶时间较长并希望得到较大的结晶时，pH 值可选择离等电点远一些，但必须保证这些分子的生物活性不受到损害。高野常広、森本英树等对细胞色素 c (氧化型) 的结晶条件做了一系列研究^[7]。细胞色素 c 浓度从 0.17% 至 5.0% 结晶溶液所选用的 pH 从 5.0、6.0、6.6、7.0、7.6 至 8.0，硫酸铵饱和度 (%) 从 67% 至 85% 范围，实验结果表明，细胞色素 c (氧化型) 结晶时最佳条件为：样品浓度为 1%，pH6.0 左右生成的结晶最佳。细胞色素 c (氧化型) 对 pH 值范围要求很窄，超过 pH6.6 或不到 5.0，虽然增大细胞色素 c 的浓度，也得不到结晶。当然对不同蛋白质及生化物质结晶时所要求 pH 范围宽窄不一，当视具体情况而定。

(三) 结晶的时间

晶核形成后，在晶核表面即密集着大量待结晶的溶质，这些待结晶溶质先铺满一层晶面后才开始铺第二层晶面，最后得到内部十分整齐排列的晶体。

结晶的速度以单位时间内在单位晶体表面上所结晶的量来表示。当结晶速度为一定时，单位时间内总结晶量与结晶总表面积成正比。一定重量的结晶所含晶体数目愈多，则总面积愈大，单位时间内总的结晶量也愈大。也就是说生成晶体数量很多，但颗粒较小。所以结晶速度太快，不仅结晶粒小，而且常常含杂质多。因为在重量相同的条件下，小晶体的巨大的总表面积对杂质吸附的机会要比大晶体多。故大的晶体总比小的晶体纯净。

蛋白质、酶等生物大分子结晶时，由于分子内有着许多功能团和活性部位，其结晶的形成过程也复杂得多。简单的无机或有机分子形成晶核时需要几十个甚至几百个离子或分子组成。但蛋白质分子形成晶核时，只有很少几个分子即可。不过这几个分子整齐排列成晶核时，比几十个几百个小分子、离子所费时间要多得多。所以蛋白质、酶、核酸等生物大分子形成结晶常需要较长时间，如 Bernal 和 Crowfoot 在 1934 年制备用于 X 射线衍射的胃蛋白酶结晶花了几个月才完成。现在，由于方法的进步，结晶一个生物大分子时间比

以往少得多了，如最近梁栋材等用微量静置法，在柠檬酸缓冲液中，培养出可供X射线结构分析用的B链NH₂端L-蛋氨酸牛胰岛素单晶，晶体大小可达 $1.0 \times 1.0 \times 1.0 \text{ mm}^3$ ，外形为正棱十二面体，只用了四周时间^[8]，当然不同物质或不同实验要求所需要的结晶时间长短不同。但欲得到纯净，整齐的大结晶体都必需一定结晶时间。

(四) 搅拌

搅拌主要使晶体与母液均匀地接触，搅拌的快慢，对晶体大小和均匀度有一定影响，搅太剧烈会损坏晶体并影响晶体的生长。搅拌速度太慢，不能保持整个结晶器中低过饱和度的恒定，甚至使大部分晶体颗粒都积沉在容器底部，晶体生长不均匀，一般工业大生产所设计的搅拌结晶装置，各种搅拌器的搅拌转数多以5—15转/分为宜。

第四节 结晶衍生物及重结晶^[2,6,9]

一、结晶衍生物

生物体内某些组份，其游离状态很难形成结晶，可考虑先制成立晶衍生物，然后用其他方法复原。例如有机酸类与钙、钾、钠成盐，某些生物碱及具有碱性基团的胺类与有机酸或无机酸成盐，均可获得很好结晶衍生物，然后通过适当方法使之复原。有些生物大分子的结晶，也可以先通过形成无活性的结晶衍生物，如酵母烯醇化酶和木瓜蛋白酶与汞结合，生成无活性的汞烯醇化酶和汞木瓜蛋白酶结晶衍生物，再经透析除去汞，便可获得活性的烯醇化酶和木瓜蛋白酶。

二、重结晶

重结晶是生化制备最后阶段常用的一种精制方法，当粗结晶获得后，再结晶则可得到更纯的产物。重结晶时宜选用对制备物比较难溶而对杂质较易溶解的溶剂条件，有时还需要用两种不同溶剂分别除去一些彼此性质相近的杂质和共沉组份。并尽可能利用温度差及其他改变溶解度的因素，使通过重结晶获得较纯的晶体。

如粗结晶中含有两种以上的成份，它们在溶剂条件下溶解度存在差别，常用分步结晶法使之分离。分步结晶时，一般将粗晶中含量最多的成份，通过溶剂选择及温度差方法，使之首先分离出来，然后再把留在母液中其他成份逐个地处理分开。分步结晶的方法如图8-4所示：

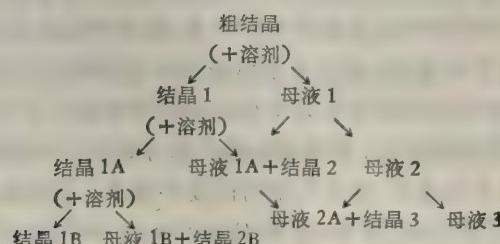


图 8-4 三角形分步重结晶示意图

实验操作时，先将粗结晶溶于少量选好的溶剂中，并经一定操作后，使达稍过饱和状态，放置后得结晶1。离心或过滤后与母液1分开，结晶1再在新鲜的溶剂中重结晶，得结晶1A和母液1A。再把上一步得到的母液1浓缩使之析出结晶2和母液2，然后再使结晶2与母液1合并再结晶，得结晶2A与母液2A。如此交互进行再结晶，在某一溶剂系统中溶解度低的一方得近似单一成份的结晶物质，而在另一方的母液中含有溶解度高的物质，最后通过鉴定可分别获得不同组份的晶体。

物质经过结晶与重结晶后，所得的晶体虽然纯度有很大的提高，但还不能说已经达到十分纯的程度了。有时须经多次重结晶，直至恒定状态，并通过各种方法的鉴定才能判断晶体的纯度情况。鉴定晶体纯度和鉴定固态或液态生化物质纯度的方法基本相同，但晶体常可从外形观察晶形是否一致及色泽是否均匀加以判断，另外还可以从下面几方面鉴定其纯度：

1. 熔点及熔距测定是否符合规定范围。
2. 层析、电泳的均一性的鉴定。
3. 光学活性的物质的旋光测定及其它光谱法鉴定。
4. 生物大分子晶体物质的纯度除参考上述2, 3二点测定方法外，还可进行生物活性测定。

以上分析工作均以标准品为对照，以判断其相对“纯度”。

第五节 结晶的一般方法

在工业上，结晶的方法在原理上常分为两大类，第一类是除去一部分溶剂，如蒸发浓缩使溶液产生过饱和状态而析出结晶。第二类是不除去溶剂，而用直接加入沉淀剂及降低温度等方法，使溶液达到饱和状态而析出结晶。实际上常是两者结合使用较多。在实验室进行一些生化组份结晶可细分为下列几种方法：(1) 盐析法：主要用于大分子如蛋白质、酶、多肽等物质的结晶。因为这些大分子不耐热，对pH变化及许多有机溶剂的使用均十分敏感，而使用中性盐作为沉淀剂，降低这些物质的溶解度而产生结晶，不仅安全而操作简便。盐析结晶法和本书第三章所讨论的盐析沉淀法原理相同，并按照加盐的方式不同而分为加固体盐法，加饱和盐溶液法和透析扩散法。(2) 有机溶剂结晶法：此法较常用于一些小分子物质的结晶，如氨基酸、核苷酸类等。固醇类在有机溶剂中也很易获得结晶。如用一些低极性溶剂提取固醇类时，酯类常被皂化生成水溶性脂肪酸钠盐和甘油，固醇类存在于中性不皂化部分。此时再用有机溶剂把固醇抽提于甲醇或丙酮中，浓缩后很快形成白色鳞片状结晶析出。某些蛋白质也可以在稀的有机溶剂中进行结晶，但常保持比较低的温度以防止蛋白质的变性。(3) 等电点结晶法：多用于一些两性物质。(4) 其它：如利用温度差法，加入金属离子法等。现以上海东风生化试剂厂所提供资料为主^[10]，并结合国内一些生产单位近年来在生产及实验中应用的一些结晶方法，举例如下：

(一) 盐析法：

1. 加固体盐法

例：酵母醇脱氢酶的结晶：

100 克干面包酵母经磷酸缓冲液提取，热变性除杂蛋白，用各种方法纯化至一定程度后，用冷丙酮沉淀，得酵母醇脱氢粗酶，沉淀悬浮于 50 毫升含 0.01% 融合剂和 0.001M 半胱氨酸溶液中。对 3 升 0.001M 磷酸缓冲液 (pH7.5) 透析 3 小时，离心除去沉淀。在每 100 毫升上清液中缓慢加入粉末硫酸铵 36 克，边加边搅拌，在 0°C 下放置 30 分钟后离心。沉淀溶于 20 毫升蒸馏水中，再加入 4 克硫酸铵粉末，离心。上清液加入 4 克硫酸铵粉末（缓慢地在几个钟头内加完）。此时溶液呈微混浊状，冰箱放置直至结晶完全。

2. 加饱和盐溶液的方法

例 1：牛胰核糖核酸酶的结晶*

经纯化后的牛胰核糖核酸酶，用 70% 饱和硫酸铵沉淀所得的牛胰核糖核酸酶滤饼 1 克，溶于 1 毫升水中，稀释至 2 毫升。逐滴加入饱和硫酸铵至微浑，然后加 1N NaOH，使 pH 至 4.6，20°C 放置待析出结晶。若硫酸铵浓度过高时出现沉淀，这种沉淀有时在 3—4 天后能转化成晶体。若沉淀过多，并不变成晶体，可逐滴加入水促使转成结晶，3—4 天后结晶完全，得针状晶体。

例 2：溶菌酶的结晶

初步纯化后的 400 毫克溶菌酶溶解在 5 毫升 0.04M pH 4.7 的醋酸缓冲液中，缓慢搅拌 5 分钟（避免出现泡沫）使完全溶解。后慢加入 5 毫升 10% (W/V) 氯化钠溶液，边加边搅拌，5 分钟内加完，过滤。滤液转到一个塑料容器中，室温下放置 2 天后结晶析出。

3. 透析法

例：羊胰蛋白酶结晶

盐析法获得羊胰蛋白酶粗品，溶于 0.4M、pH9 硼酸缓冲液中，过滤。滤液加入等量“结晶透析液”（0.4M 硼酸缓冲液与等体积饱和硫酸镁混合，以饱和碳酸钾调 pH8.0），装入透析袋内，于 0~5°C 对上述结晶透析液透析，每天换结晶透析液一次，3—4 天后出现结晶，7 天内结晶完全。

(二) 用有机溶剂结晶法

1. 直接加有机溶剂结晶的方法

例 1：丙氨酸的结晶*

从层析柱上收集已达低层析纯的丙氨酸溶液，合并后减压浓缩至 $\frac{1}{10}$ 体积，趁热缓慢地加入两倍体积热的 95% 乙醇，结晶逐渐析出。冷却放置过夜，使结晶完全。

例 2：麦芽糖的结晶*

饴糖用 80% 乙醇搅拌抽提，上清液浓缩除去大部分乙醇，后用水稀释，依次上阳离子和阴离子交换树脂柱。从交换柱下来的糖液浓缩至比重 1.35 左右。趁热倒入缸内，稍冷后加入等体积的浓乙醇，边加边搅拌，并加入少量晶种。放置半个月以上，结晶完全。

糖液浓缩时，必须控制合适的浓度，太浓不易结晶；即使结晶，晶体质量也很差。过稀时，结晶不完全。

例 3：赤霉素的结晶*

5 克粗的赤霉素加 500 毫升乙酸乙酯加热回流半小时，大部分溶解后，脱色，过滤。滤液慢慢加入 1250 毫升石油醚，即生成赤霉素结晶。

2. 利用挥发性溶剂蒸发结晶方法*

例 1：1-二甲胺-5-萘磺酰氯的结晶*

1-二甲胺-5-萘磺酸和五氯化磷混研，后滴入冰水中。油状物用乙酸乙酯抽提。抽提液用水洗3—4次，用无水氯化钙干燥1—2天，过滤。滤液于40℃水浴中减压浓缩至干，得1-二甲胺-5-萘磺酰氯粗结晶。粗结晶用石油醚溶解，过滤。滤液在30℃水浴减压浓缩至干，得橙色1-二甲胺-5-萘磺酰氯结晶。

例 2：麦角固醇的结晶及重结晶

干酵母粉以82—84%乙醇搅拌抽提18—24小时。蒸汽加热到70—75℃保温3小时，冷至30℃以下过滤。滤渣复提3次，过滤。滤液合并减压浓缩得膏状物，加5—10%的水溶解，再加3—5倍体积的乙醚，剧烈搅拌2—3小时，静置16—20小时，吸出上清液于—5℃冰箱中放置一天后析出结晶。粗结晶滤集后加10倍量的醚酮混合液，在50—54℃隔层水浴中保温30—40分钟(间断搅拌)静置，后吸出上清液于—5℃下放置过夜，得白色针状结晶。

(三) 等电点结晶法

例：乙酰-DL-色氨酸的重结晶*

2.5公斤粗乙酰-DL-色氨酸加1.2—1.3升5N氢氧化钠溶解，40克活性炭脱色后过滤，滤液在10℃以下用冰醋酸调pH3，缓慢搅拌即逐渐出现大量结晶。

(四) 利用温度差结晶法

例：葡萄糖-1-磷酸钡盐的重结晶*

葡萄糖-1-磷酸钡盐的粗结晶溶于20倍体积的0.05N盐酸中，过滤除去不溶物。清液在80℃水浴中加热到60—65℃，后用1N氢氧化钠调pH7.0，乘热过滤除去无机盐沉淀。清液在4℃冰箱中放置24小时，得葡萄糖-1-磷酸钡盐的片状结晶。

(五) 加金属离子结晶法

例：铁蛋白的结晶法*

狗肝的水抽提液加硫酸铵至50%饱和度，沉淀后将沉淀再溶于少量蒸馏水中。每100毫升溶液缓慢加入5克固体硫酸镉，冰箱放置过夜，得红褐色菱形含镉的铁蛋白结晶。

(以上标明有*号者为上海东风生化试剂厂内部总结资料，没有*者摘自上海生化制药厂，上海酵母厂，武汉生化制药厂的生产工艺规程。)

第六节 有关蛋白质结晶的几项技术

一、抽提结晶技术

这是 Jakoby 介绍的一个比较成功的蛋白质用不同浓度硫酸铵抽提结晶的方法^[11]。当

蛋白质被提纯至一定纯度，经浓缩至每毫升含蛋白质量 1—2 毫克后，加入足量固体硫酸铵使蛋白质沉淀。然后用硫酸铵由高到低的浓度在 0 °C附近进行抽提，按照蛋白质在硫酸铵中低温溶解度大，温度逐渐升高，溶解度反而减少的规律，将低温抽提的蛋白质溶液置室温中即可析出结晶。

在分步抽提中，溶解在高浓度硫酸铵中的蛋白质首先被抽提，然后按各种蛋白质在不同盐浓度下的溶解度差别而彼此分离。

具体实验时，先选好已提纯蛋白质或酶的硫酸铵盐析范围。如某一酶蛋白的硫酸铵盐析沉淀范围在 45—60% 饱和度之间，选用硫酸铵抽提的饱和度依次为 65、61、58 和 52%。如果盐析沉淀范围为 25—35% 饱和度之间，则选用硫酸铵抽提的饱和度依次为 38、36、34 和 32%。如在实验中发现所用硫酸铵浓度梯度太高或太低，可按实际情况加以调整，直至增减到所需提纯组份产生结晶为止。一般来说，低温抽提液转至室温后，几小时或几天以后即可出现结晶。表 8-1 是一些蛋白质抽提盐浓度及结晶情况^[12]。

Jakoby 法已十分成功地抽提结晶了一百多种酶蛋白，晶体轴长一般为 1—4 微米，最大可达 50 微米，可供 X 射线分析使用。另外，此法对分离纯化蛋白质也是十分有用的技术。现以微生物研究所用此法抽提结晶红曲霉葡萄糖淀粉酶为例，具体介绍如下^[13]：

红曲霉 As3, 978 的变异株 As 3.2199 菌株生产的葡萄糖淀粉酶经过抽提，硫酸铵(70% 饱和度)盐析沉淀，Sephadex G25 凝胶柱过滤脱盐，后上 DEAE-纤维素柱。所得酶浓缩液对蒸馏水透析除盐，在冰浴中慢慢加入预先磨细的分析纯硫酸铵达饱和，放冰箱中过夜。然后 0 °C 下离心，弃去上清液。根据预先所作硫酸铵从低至高浓度的分步抽试验结果，选用饱和度为 60、56、52、50% 的硫酸铵；由高到低浓度地依次进行抽提。每次抽提后，将抽提液放入冰浴中 20—30 分钟。然后在 0 °C 离心 (12,000 转/分) 20 分钟，

表 8-1 一些蛋白质抽提结晶的条件

蛋白质	分子量	缓冲溶液 (mM)	pH	添加物	盐浓度 (%饱和度)	结晶 回收率(%)
甲状腺球蛋白	660,000	—	—	1% NaCl	42,39,37	70
醇脱氢酶	200,000	磷酸缓冲液 (50mM)	7.0	25% 甘油 + 50mM 2,3-羟基丙硫醇	55,51,47,43	<30
羟基丙二酸半醛还原酶	—	Tris 缓冲液 (40mM)	7.4	50mM 疏基乙醇	55,45,40,35	50
羟基丙二酸半醛还原酶	104,000	磷酸缓冲液 (100mM)	7.0	30mM 疏基乙醇	55,45,40,35	75
苹果酸脱氢酶	43,000	磷酸缓冲液 (30mM)	7.2		60, 55	35
酒石酸脱氢酶					55,45,40,35	40
”					65,50,45,36	90
羟丙酮酸还原酶	76,000	磷酸缓冲液 (30mM)	7.2	3mM 疏基乙醇	50,45,40,35	70

立即将上清液倒入带塞玻璃试管中，放入4℃冰箱。后每隔10—12小时交替放入7℃和4℃的冰箱中（而不是室温中），过5天即出现大量沉淀。继续在7℃长时间放置，每隔1—2周用偏光显微镜检查，数周后出现针状结晶及晶簇。随着时间的延长，晶簇增多并长大，（50—100微米），由麦捆状变成放射状以至球状。摇动试管可以见到明显的丝光。三批结晶试验的结果如表8-2所示。

表8-2 用 Jakoby 法进行葡萄糖淀粉酶结晶情况

实验批号	起始样品	硫酸铵抽提液		出现混浊的时间(小时)	蛋白质沉淀量(目测)	看到结晶的时间(天)
		饱和度%	毫升			
1	部分 II 30毫升含蛋白 质65毫克	60	2	—	—	—
		56	2	72	++++	60
		54	2	1.5	++++	45
		52	2	20	+++	胶冻状
		50	2	—	—	—
2	部分 II 30毫升含蛋白 质100毫克	56*	2	>72	+	—
		54	2	1	++++	50
		52	2	1	++++	40
3	部分 II 30毫升含蛋白 质130毫克	60	3	—	—	—
		56	3	>72	+	—
		54	3	24	+++	42
		52	3	24	++++	25

* 实验操作有失误。

二、蛋白质微量结晶技术

(一) 热盒技术——溶解度温度梯度法^[3]

热盒技术适合于某些对温度比较稳定、而在高温中比在室温下有较大溶解度的蛋白质。其原理和利用温度差进行结晶相同，设计也很简单，如图8-5所示。

操作时，先将蛋白质在较高温度下溶于结晶介质中，并装入一带塞试管内，试管悬挂在一内装有热水的热水瓶里。管口露出水面，以免热水浸入试管造成污染。然后把热水瓶垂直放置在一木盒内，盒内四周用聚苯乙烯填满，使热水瓶固定不动。上面加上木盖盖紧，让热盒缓慢冷却，当试管内的蛋白质溶液到达一定温度即开始析出结晶。

图8-5是用来结晶胰岛素的一个热盒装置。热盒及蛋白质溶液最初均处在50℃的高温下，渐渐冷却至25℃时，大的胰岛素结晶即开始形成。如冷却温度低于20℃，溶液过饱和度太大，反而形成晶体较小。此法曾成功制备了胰高血糖素和胰岛素的结晶。这两种蛋白质在50℃低离子强度缓冲液中都比较稳定和有较高溶解度。

(二) 平衡透析技术

平衡透析技术早在 1932 年已由 Theorell 介绍并于 1947 年由 Boyes—Watson 等人用

于结晶血红蛋白^[14]。其原理是通过一个半透膜把蛋白质溶液与外界结晶介质隔开，膜只允许小分子和溶剂透过，而阻止蛋白质的透过。半透膜可用玻璃纸或其它一些赛璐珞衍生物制成，膜内蛋白质溶液的 pH 值及离子强度可通过膜外介质的扩散进行调节，直至到达蛋白质形成结晶时最适的条件为止。此法的优点是，结晶条件的变化可通过控制扩散作用，缓慢地到达结晶核化点。使晶体的生长颗粒大，整齐均匀。如蛋白质在某种条件下出现无定形沉淀和小晶体，可以人为地改变膜外部溶液的条件，使沉淀溶解，再调整到形成较大而均匀的晶体。平衡透析结晶法，可在不同 pH 和不同溶剂条件下进行。此法也适用于某些需要金属离子的



图 8-5 胰岛素热盒结晶方法示意图

蛋白质结晶。操作和一般透析法相同。方法并不难，只是需要耐心摸出结晶的适合条件便可获得结晶，有时在结晶形成后还需进一步改变外部缓冲液的浓度及 pH 值，结晶才能完成。平衡透析方法已成功地用于制备多种蛋白质的大结晶。可作为常量结晶，也可以进行微量结晶。如 Zeppezauer 设计的各种微量毛细管及穴洞透析扩散器，小的只有几微升，大的也不过几十微升，也就是说，只要一滴那么多的蛋白质溶液便可进行实验。其装置形状举例如图 8-6, 8-7^[15,16]。

图 8-6 是一种毛细管式扩散透析结晶装置。图 8-6(a) 毛细管上的膜用有三个“脚”的 PVC 环固定，使膜稍离开容器底部，以免损坏膜。操作时，把装有蛋白质溶液的毛细管垂直置于结晶介质中，通过改变结晶介质的条件促使毛细管中蛋白质结晶的形成。图 8-6(b) 是毛细管的一端放大图。各种毛细管扩散透析器一般内径为 0.5—1 微米，长为 20—50 微米，能装 10—30 微升蛋白质溶液，这对于样品是十分节约的。

图 8-7 为洞穴式扩散透析结晶器，其小室完全使用光学处理过的玻璃制成，不用取出结晶即可直接用显微镜观察。因此它比毛细管扩散透析装置更易控制晶体生长时间。

(三) 蒸发扩散技术

待结晶溶液通过蒸发作用使浓度增加，最后达到过饱和度而析出结晶，这是小分子传统结晶方法。但简单的蒸发作用很难控制饱和度并容易造成盐类在母液中形成晶体，故过去较少用于制备高纯度蛋白质结晶。近年来，通过浓盐溶液与结晶溶液蒸发扩散的平衡作用，使此技术具有了更大的灵敏度，用于蛋白质和 tRNA 的结晶逐渐增多^[17—20]。其方法原理是：先将蛋白质溶于一个适当浓度（低于沉淀所需浓度的 10% 左右）的盐溶液中，并使蛋白质含量约为 1 毫克/毫升。另在一大容器中盛放高浓度的盐溶液，二者同时置于一密封干燥器中。于是蛋白质溶液中的溶剂，通过蒸发逐渐转到较浓的盐溶液中，直至到

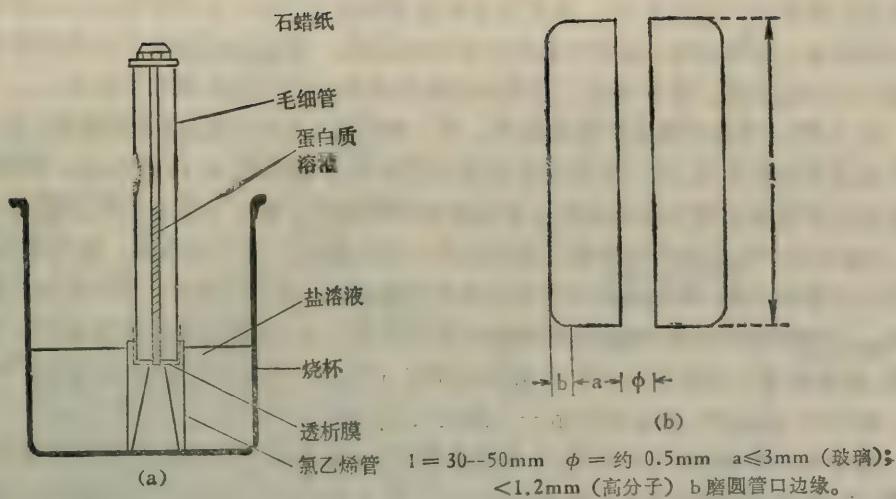
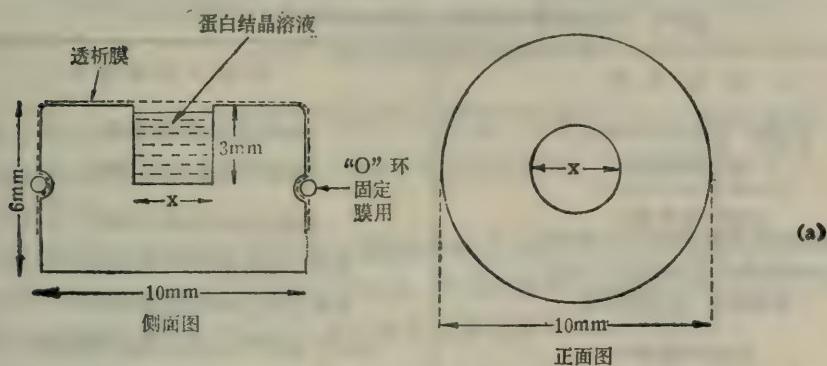


图 8-6 毛细管扩散透析结晶器

(a) 毛细管扩散透析结晶装置 (b) 毛细管磨圆的管口边(以免磨破透析膜)。



x (mm)	小室容量 (μl)
1.4	5
2.0	10
3.0	20
4.0	40
4.5	50

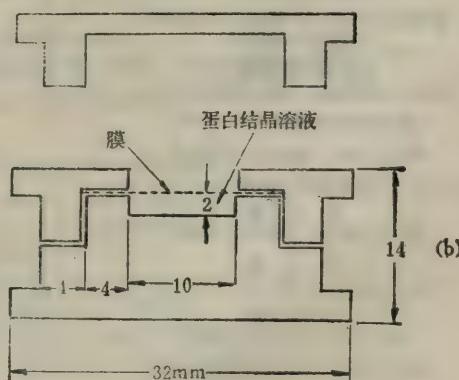


图 8-7 穴洞式扩散透析结晶器

(a) 透析器侧面及正面图 (b) 透析器全套装置示意图

达平衡为止。当蛋白质溶液中的溶剂蒸发到一定程度后，蛋白质便从溶液中结晶析出。如果结晶的介质不是盐溶液，而是易挥发的与水混合的有机溶剂，则不需要在蛋白质溶液中先加入有机溶剂（加入一定缓冲液及调整 pH 值仍是必要的），通过有机溶剂的蒸发，

很快便扩散到蛋白质溶液中。如所用有机溶剂挥发性不强，也可事先加入适量有机溶剂到待结晶蛋白质溶液中，这样可避免平衡时间过长。当蛋白质溶液中的有机溶剂到适量时便开始形成结晶。图 8-8 是二种简单的微量蒸发扩散结晶装置的示意图。

图 8-8(a) 为碟式蒸发扩散结晶器。用一塑料盒(或培养皿)将底部隔开二半，一半放置浓盐液或有机溶剂，另一半放待结晶蛋白质溶液，一次可结晶 16 个样品。操作时，先将盛放蛋白质溶液的玻片硅化以防止蛋白质溶液的散开。整个装置密封后放置在一定温度下，当蛋白质中溶剂蒸发或吸收有机溶剂至一定浓度后，即开始结晶。图 8-8(b) 为悬滴式蒸发扩散结晶器，容器底部为浓盐液或有机溶剂，上面用一玻片，其中央加一滴蛋白质溶液。反过来盖住容器，密封后即可进行蒸发结晶。此法比较简易，容易操作。下面以毕汝昌、雷克健等人用微量气相扩散法对猪和牛 $[Trp]^{B_1}$ 胰岛素进行结晶为例：

猪和牛 $[Trp]^{B_1}$ 胰岛素结晶——微量气相扩散法^[21]

晶体生长甲液为 0.02NHCl，1% 蛋白质溶液；晶体生长乙液为含 0.07% 氯化锌，30% 丙酮，0.2M 柠檬酸钠。对生长猪和牛 $[Trp]^{B_1}$ 胰岛素晶体，乙液的 pH 分别调至 6.9 和 7.7。生长晶体时将甲乙二液等体积混合，按每滴 5—100 微升分滴滴在预先硅化的康维皿内。

表 8-3 X 射线衍射研究用的一些生物高聚物的结晶方法^[16]

生物高聚物	结晶方法和条件
醛缩酶 (rabbit muscle)	高离子强度分步结晶法
天门冬酰胺酶 (<i>Erwinia carotovora</i>)	在低离子强度下加入乙醇
细菌叶绿素蛋白 (<i>Chloropseudomonas ethylicum</i>)	缓慢地平衡到高离子强度
本琼氏蛋白 (human L-type)	低离子强度，微细管平衡透析法
细胞色素 c 过氧化物酶 (Yeast)	低离子强度，微细管平衡透析法
人血浆铜蓝蛋白	低离子强度；等电点附近缓慢蒸发结晶
细胞色素 b5 (calf liver) (rabbit liver)	高离子强度分步结晶法，或平衡透析法
抗原结合片断 (human myeloma protein IgG1)	高离子强度；平衡透析法
黄素氧化还原蛋白 (<i>Clostridium pasteurianum</i>)	pH6.4—6.8，高离子强度，微细管平衡透析法
谷氨酰胺合成酶 (<i>E. coli</i>)	高离子强度分步结晶法
聚肌红蛋白 (sperm whale)	高 pH 值和高离子强度分步结晶法
肌红蛋白 (tuna)	高离子强度分步结晶法
蛋白酶 (<i>Penicillium janthinellum</i>)	高离子强度，缓慢蒸发结晶法
蛋白酶 (<i>Sorangium sp. Myxobacter 405</i>)	高离子强度，微细管平衡透析法
蛋白酶 (Strain of <i>Arthrobacter</i>)	高离子强度，微细管平衡透析法
原肌球蛋白 (rabbit muscle)	中度的高离子强度，平衡透析法
甲状腺球蛋白	高离子强度，温度梯度结晶法 (Jackoby 法)
转移 RNA	溶剂平衡或等温蒸馏，再助以温度梯度法
转移 RNA	分步结晶法
硫氧化蛋白 (<i>E. coli</i>)	在等电点附近，微细管平衡透析法
番茄浓缩病毒	高离子强度，分步结晶法

(注：本表中所列作者文献从略)

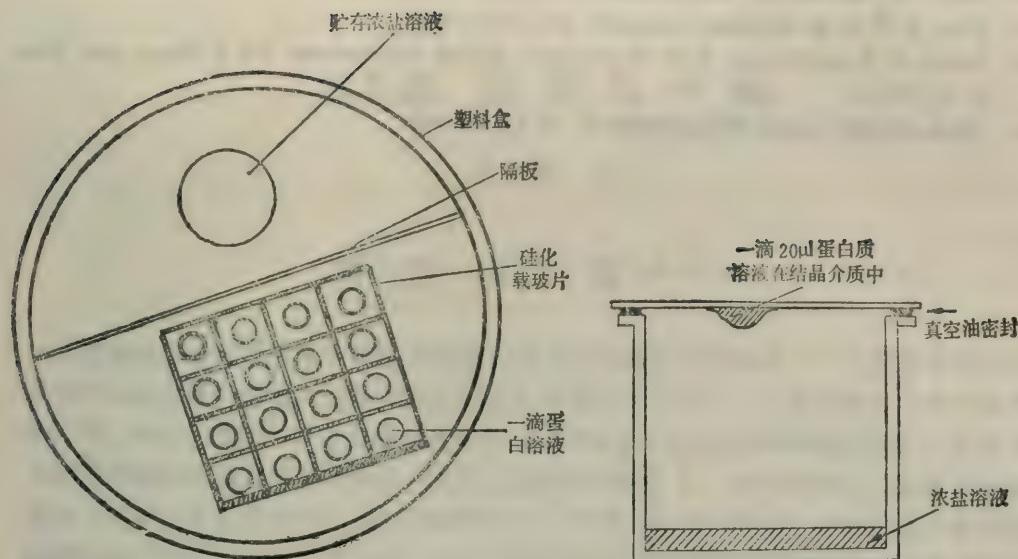


图 8-8 微量蒸发扩散结晶装置示意图

室，再将 10 毫升的乙液置于康维皿外室中，然后盖上玻璃片，加真空油脂封密，于培养箱放置 1 至数周，即形成晶体，大小为 0.5 至 0.7 毫米的单晶，外形为菱形六面体，可供 X 射线结构分析之用。

微量结晶方法还有多种装置，由于篇幅限制，这里就不一一介绍了。微量结晶法的优点是使用样品较少，所得的蛋白质结晶较大，可用使 X 射线衍射的分析。关于专供 X 射线衍射用的一些生物大分子的结晶方法和条件可参考表 8-3。

参 考 文 献

- [1] 唐有祺编著：结晶化学，1—31页，高等教育出版社(1960)
- [2] 中国科学院药物研究所编：中草药有效成份的研究，第一分册，54页，人民卫生出版社 (1972)
- [3] Blundell, T. L. and Johnson, L. N., Protein Crystallography, P. 60—71, Academic Press, New York (1976)
- [4] 《微生物工程》编写组：微生物工程，下册，121 页，上海科学技术出版社 (1982)
- [5] Dobler, M., Dover, S. D., Laves, L., Binder, A. and Zuber, H., J. Mol. Biol., 71, 785 (1972)
- [6] 有机化学实验技术编写组编：有机化学实验技术，97页，科学出版社 (1978)
- [7] 高野常広,森本英树：日本结晶学会誌 9, 216(1976)
- [8] 梁栋材、万柱礼：生物化学与生物物理学报 14(5), 449(1982)
- [9] 米原弘,高桥信孝,大岳望：(日)化学と生物, 5(1), 37—44(1967)
- [10] 中国科学院上物生物化学研究所东风试剂厂内部生产总结资料, (1980)
- [11] Jakoby, W. B., Methods in Enzymology, Vol. 22, P. 248 (1971)
- [12] Jakoby, W. B. et al. *Anal. Biochem.* 26, 295(1968)
- [13] 中国科学院北京微生物研究所酶结构功能组：微生物学报, 16(3), 200(1976)
- [14] Boyes-watson, I., Davidson, E. and Perutz, M. F., *Proc. Roy. Soc. Ser., A* 191, 83 (1947)
- [15] Zeppezauer, M., Eklund, H. and Zeppezauer, E. S., *Arch Biochem. Biophys.*, 126, 564 (1968)
- [16] Zeppezauer, M., Methods in Enzymology, Vol. 22, 253 (1971)
- [17] Davies, D. R. and Segal, D. M., Methods in Enzymology, Vol. 22, 266 (1971)

- [18] Kim S. H. and Rich, A., *Science*, **162**, 1381 (1968)
- [19] Clark, B. F. C. et al., *Nature* (London), **219**, 1222 (1968).
- [20] Davies, D. R. and Doctor, B. P., *Procedures in Nucleic Acid Research*, Vol. 2, Harper and Row, N. Y. (1971)
- [21] 毕汝昌,雷克健等: *生物化学与生物物理学報*, **14**(1), 35(1982)

第九章 浓缩与干燥

阜肇文

第一节 浓 缩^[1-9,11]

浓缩是从低浓度的溶液除去水或溶剂使之变为高浓度的溶液。生化制备中往往在提取后和结晶前进行浓缩。加热和减压蒸发是最常用的方法。一些分离提纯方法也能起浓缩作用。例如，吸收法用亲水凝胶很容易吸收稀溶液中的水分而得到浓溶液。超滤法利用半透膜能够截留大分子的性质，很适于浓缩生物大分子。离子交换法与吸附法使稀溶液通过离子交换柱或吸附柱，溶质被吸附以后，再用少量液体洗脱、分部收集能够使所需物质的浓度提高几倍以至几十倍。此外，冷冻融化、加沉淀剂、溶剂萃取、亲和层析等方法也能达到浓缩目的。有些方法已在各章中分别介绍，本节只着重于蒸发浓缩和吸收浓缩。

一、蒸 发

蒸发是溶液表面的水或溶剂分子获得的动能超过溶液内分子间的吸引力以后，脱离液面进入空间的过程。可以借助蒸发从溶液中除去水或溶剂使溶液被浓缩。

影响蒸发速度的因素如下：

- 首先是温度。溶液受热后，分子动能增加，蒸发加快。
- 其次是蒸发面积和溶剂的蒸气压。恒温时蒸发情况可以表示为：

$$m \propto \frac{S(F - f)}{P}$$

m 为单位时间的蒸发量，

S 为液体的蒸发面积，

P 为液面所受的压力，

F 为某一温度时溶剂的饱和蒸气压，

f 为某一温度时溶剂的实际蒸气压。

由上式可见：

(1) 当气压与蒸发面积恒定，而液面的溶剂蒸气压达到饱和时， $F = f$ ，压差为0，蒸发停止。要加大 F 与 f 之差，就应该不断地移去液面蒸气。采用气流吹散或使蒸气冷凝的方法都很有效。

(2) 加大蒸发面积(例如采用薄膜蒸发)可以增加蒸发量。液体沸腾也能加大蒸发面积。这时气化不限于液面；液内的气泡表面也能气化。

(3) 压力与蒸发量成反比。减压蒸发是比较理想的浓缩方法。因为减压能够在温度

不高的条件下使蒸发量增加,从而减小加热对物质的损害。

总之,实验室和生产单位在设计蒸发装置时要考虑适当加热、增大液体面积、减压与加速空气流动等因素。

(一) 实验室蒸发浓缩的方法

1. 常压蒸发 即在常压下加热使溶剂蒸发,最后溶液被浓缩。方法简单,但仅适于浓缩耐热物质及回收溶剂。

(1) 装置

(a) 浓缩而不需回收溶剂,可用蒸发皿。

(b) 在浓缩的同时回收溶剂,则应在装液容器与接受器之间安装冷凝管使溶剂的蒸气冷凝。

(2) 操作注意事项

(a) 需用圆底蒸馏瓶。装液量应不超过蒸馏瓶的 $1/2$ 容积。以免沸腾时溶液雾滴被蒸气带走或溶液冲出蒸馏瓶。

(b) 加热前需加少量沸石(或碎磁片、小的磨砂玻璃珠、一端封闭的毛细管等),使溶液不致因过热而暴沸。暴沸易使液体冲出,或使蒸馏瓶压力陡增而致破裂。蒸发过程中如沸石因空气去尽而失效,需停止加热待溶液冷却后,补加或更换沸石,因沸石中有空气,加入热液也能引起暴沸。

(c) 操作时先接通冷却水。冷却水的流速容易受水压变化的影响,要及时调节。

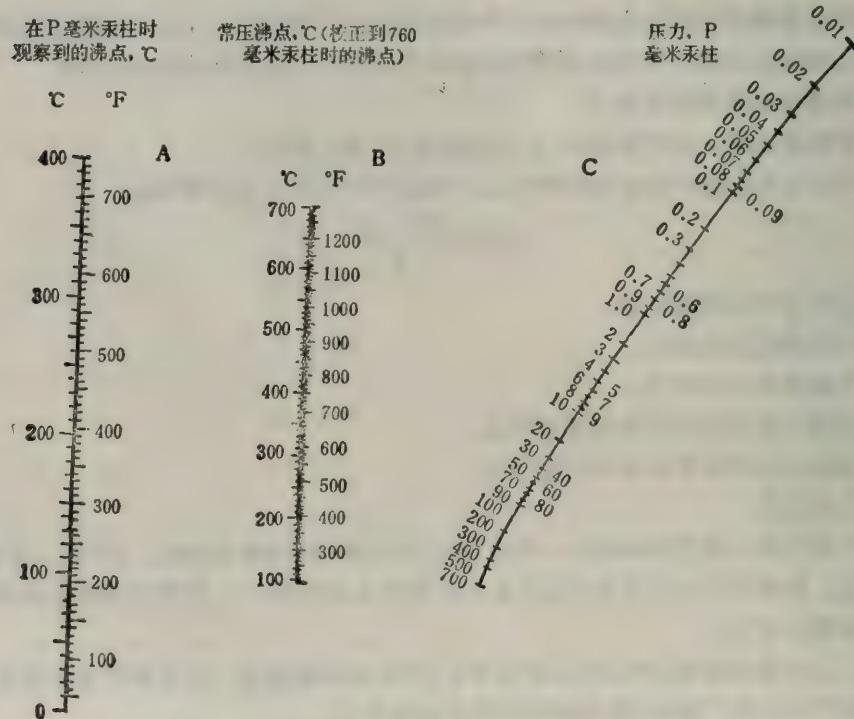


图 9-1 压力-温度直线图

(d) 选用适当的热浴，避免直接火焰加热。液体沸点低于85℃可用水浴或蒸气浴，高于85℃常用油浴。蒸馏瓶浸入热浴应使内外液面大致接近。瓶底与热浴底保持一定距离，以免碰碎。

(e) 热浴温度较溶剂沸点高20—30℃为宜，温度过高使蒸发速度太快，蒸馏瓶内的蒸气压超过大气压以后易将瓶塞冲开，逸出大量蒸气，甚至使蒸馏瓶炸裂。处理低沸点易燃或有毒物时更应注意。否则引起燃烧或爆炸将造成严重事故。此外，过热还容易使被浓缩物分解或变性。

(f) 如果出现大量气泡，可以考虑加入少许醇类(例如辛醇)或其它消泡剂。

2. 减压蒸发 与常压蒸发相比，此法所需温度低而蒸发速度快，适于浓缩不耐热的物质。其原理是使液面压力降低。而压力降低，沸点也就降低，于是蒸发加快。

从压力-温度直线图可以了解溶剂沸点与真空度的关系。

使用图9-1时，可用小尺通过表中二条直线上的各一个数据点连成直线，并且使它延长与第三条线相交，就能得到第三个数据点。

从已知真空度可求得在该真空度下溶剂的沸点。例如某液体在常压下沸点为100℃，要求得在减压至压力为50毫米汞柱时的沸点。用小尺通过B线的100℃点和C线的50毫米汞柱点，可以看到小尺与直线A相交的点为20℃。由此得知，该液体在50毫米汞柱压力下沸点为20℃。

要求溶剂沸点不得超过某一规定温度时，也可求出所需的真空度。例如某溶剂在常压下沸点为100℃，希望在20℃蒸出，同样可在C线上得知真空度应达到50毫米汞柱。

(1) 装置：

(a) 普通减压加温蒸发器：示意装置见图9-2。加热容器需用圆形或圆锥形烧瓶，先将液体加入容器，接通冷却水，再打开水泵或真空泵，开始时减压要缓慢，加热至一定温度后，溶剂即大量蒸发。如气泡过多，应立即打开阀门，降低真空度，或加入适当的消泡剂防止泡沫溢出。

(b) 旋转减压蒸发器：原理同上。改进部分为装液容器采用旋转烧瓶。旋转烧瓶由马达带动缓慢旋转，液体在瓶壁展开成膜，溶剂得以迅速蒸发。烧瓶旋转还能防止溶液暴沸。用于浓缩产品与回收溶剂时，效率很高，是实验室中比较理想的蒸发器，示意图为图9-3。

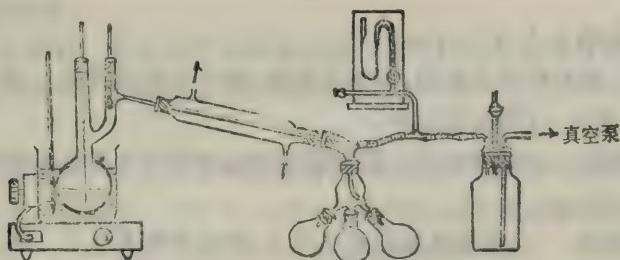


图9-2 减压加温蒸发装置

旋转蒸发器应用日益广泛。现以上海玻璃仪器二厂生产的ZHQ81-I、II型旋转蒸发器为例对旋转蒸发器的使用说明如下：

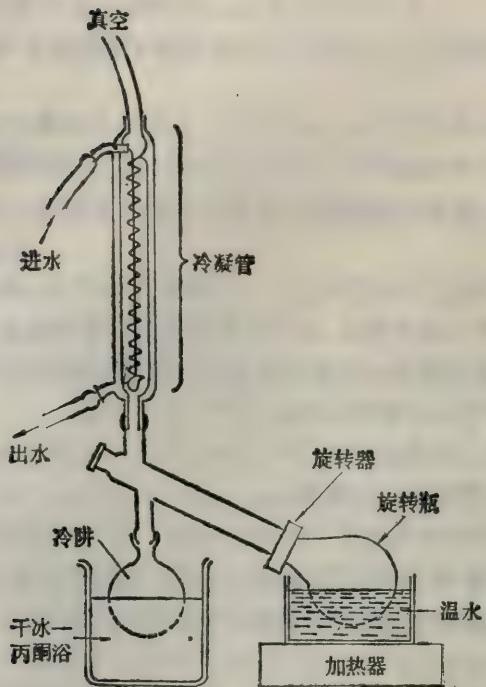


图 9-3 旋转蒸发装置示意图

几种溶剂的蒸发速度
(采用 1 升蒸发瓶转速为 100 转/分)

溶剂	沸点 (℃)	浴温 (℃)	真空度 (毫米汞柱)	400 毫升 蒸发时间 (分钟)	冷却水温 (℃)	溶剂回收量	
						(毫升)	%
水	100	50	45	69	7	390	97.6
水	100	40	5	45	7	370	92.6
丙酮	56	40	65	13	7	360	90.0
乙醇	78	40	98	30	7	390	97.6
苯	80	40	76	22	7	390	97.6

装配示意图见图 9-4、9-5、9-6。

支架的安装：将座杆套上垫套，用弹簧垫圈、螺母与底座固定。把升降座杠杆、固定套、联接支架套入座杆，支架安装完毕。

传动部分的安装：支架装好后，将传动部分的套管套入联接支架的主轴上，旋紧旋钮，使传动部分固定。

夹头部分的组合：先将夹头套在夹头杆上，然后再将夹头杆，插入传动部分的盖子上，并用夹头杆调整旋钮旋紧。

机架部分的使用

传动部分的升降移动：将升降调节杆手柄逆时针旋转，使它与杠杆的螺纹联接放松，按动手柄，使传动部分随杠杆的作用而上下升降运动，到达预定位置，顺时针拧紧升降调

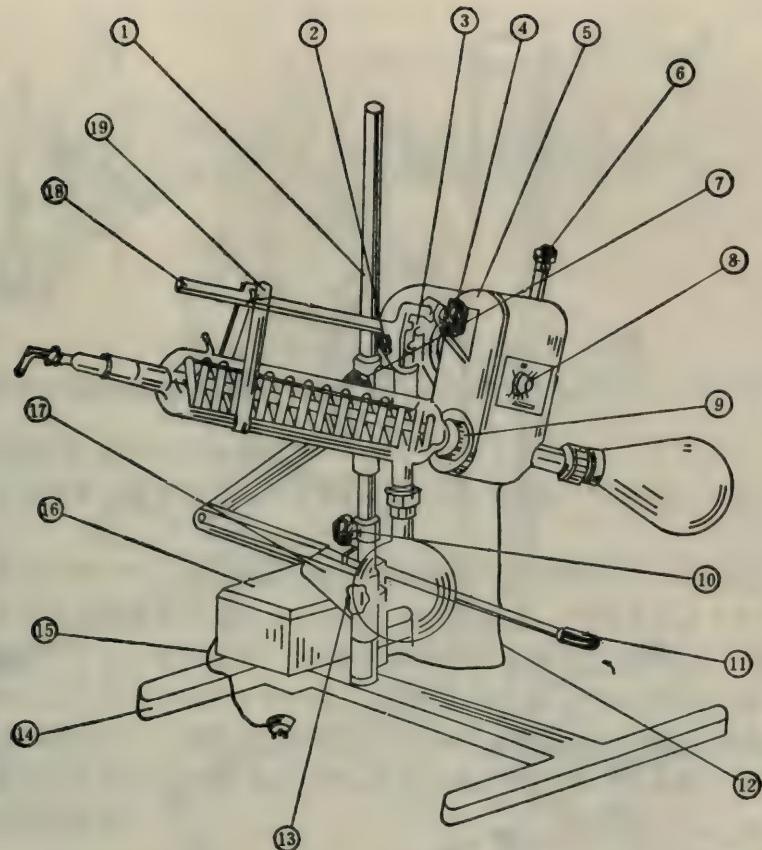


图 9-4

1. 座杆, 2. 传动部份固定旋钮, 3. 联接支架, 4. 夹头杆调正旋钮, 5. 传动部份, 6. 传动部份角度调节旋钮, 7. 水平旋转旋钮, 8. 调速旋钮, 9. 联轴杆螺母, 10. 升降固定旋钮, 11. 升降调节手柄, 12. 传动部份电源线, 13. 手柄水平旋转旋钮, 14. 底座, 15. 电源线, 16. 变压器罩, 17. 升降杠杆, 18. 夹头杆 19. 夹头

节杆与杠杆的螺纹联接, 再用固定套使联接支架的位置固定。

升降调节杆的水平旋转: 放松手柄的水平旋转旋钮, 手柄便可左右偏转。到达所需位置时, 把旋钮拧紧即可。

传动部分的水平旋转: 放松水平旋转旋钮就可使传动部分左右移动。

传动部分的角度调节: 放松角度调节旋钮, 传动部分即可在垂直平面内偏转, 选定位置后拧紧旋钮。

夹头部分的安装使用: 松开夹头杆调整旋钮, 可以调节夹头杆与传动部分的角度, 使之适于夹固不同角度的冷凝器。用于 81-I 型时, 松开夹头顶部的螺丝可以变化夹头在夹头杆上的位置, 若用于 81-II 型时, 松开夹头, 并将它旋转 90°。

旋转速度的调节: 将传动部分电源线的插头, 插入变压器罩上的电源插座中, 再把电源线的插头插入 220V 电源, 旋转调速旋钮即可任意变速 (10—190 r.p.m.)。

衬垫的使用: 把玻璃旋转轴插入传动部分的锥套内, 如图 9-5 所示方向依次装上油封、聚四氟乙烯垫片和玻璃法兰。

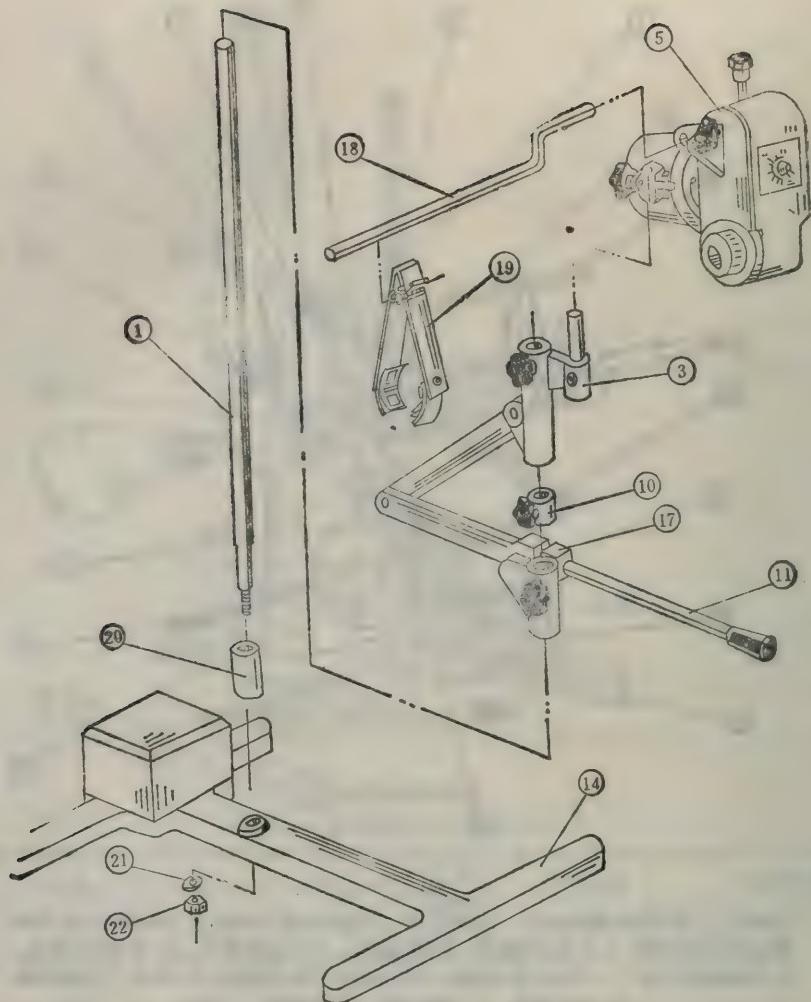


图 9-5 ZFQ81-1 型旋转蒸发装置固定部件示意图

1. 座杆, 3. 联接支架, 5. 传动部份, 10. 固定套, 11. 升降调节杆, 14. 底座,
17. 杠杆, 18. 夹头杆, 19. 夹头, 20. 垫套, 21. 弹簧垫圈, 22. 螺母

玻璃部件的安装

装拆玻璃旋转轴: 将玻璃旋转轴从传动部分的背面插入锥套内, 当轴套外口的卡环卡住玻璃旋转轴的轴肩即可。在拆卸玻璃旋转轴时, 左手抓住传动部分, 少许用力往后拉即可拔出。若玻璃轴与锥套结合较紧, 可卸下冷凝管, 右手握住玻璃轴, 用左手掌心轻轻拍击玻璃轴的端部, 就能取出。

冷却器的安装: 玻璃轴装入传动部分后, 在其前端依次套入油封、聚四氟乙烯片。再将冷凝管的法兰套上螺母, 并从螺母侧孔插入弹簧, 然后旋紧螺母, 联接冷凝管, 使之不漏气。

旋转烧瓶与圆底烧瓶的固定与拆卸: 烧瓶的接头口均为标准口, 并配专用接头联接。使用之前要用酒精擦净各个接头口, 然后涂真空油脂, 以免产生伤痕和漏气。减压解除

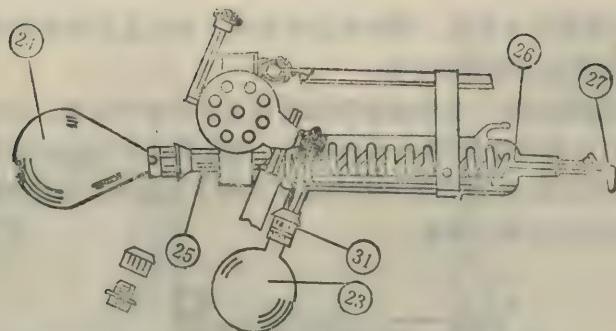


图 9-6 ZFO81-I 型冷凝器安装示意图

23. 圆底烧瓶；24. 茄形烧瓶；25. 玻璃旋转轴；26. 双迴流冷凝管；27. 加料管；31. 塑料活接头

后，将接头旋松分开，即可取下烧瓶。

(2) 关于真空间：通常把压力低于常压的空间称为真空，可分为：粗真空，中度真空，高度真空。

(a) 粗真空(气压 760—10 毫米汞柱)可用水泵达到。水泵的最大真空间受水蒸气压限制。而水蒸气压又与水温有关。水温愈高，蒸气压愈大。例如水温从 1℃ 升至 30℃，蒸汽压从 4.9 上升到 31.6 毫米汞柱。而且水温愈高，水蒸气压上升愈快。例如水温由 1℃ 升至 2℃ 时，压力只上升 0.4 毫米汞柱，而水温由 29℃ 升至 30℃ 时压力就上升 1.6 毫米汞柱。水泵装置如图 9-7，用时应在水泵前装安全瓶，以防水压陡降时水倒流进入样液，停止使用时应先打开安全瓶活塞，放入空气，再关水泵。为了保持水泵的工作效率，需经常进行清洁并定期拆洗。

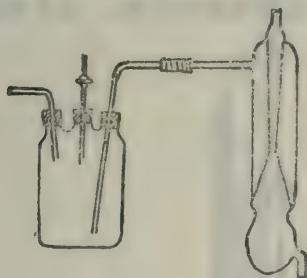


图 9-7 水泵装置

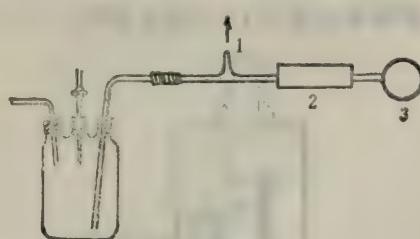


图 9-8 油泵装置

1. 接压力表；2. 干燥系统；3. 油泵

(b) 中度真空(气压 $10-10^{-3}$ 毫米汞柱)：可选用油泵，真空间可达 10^{-3} 毫米汞柱。油泵装置如图 9-8，常在安全瓶与蒸馏系统之间加冷阱，不让低沸点物或易分解物被抽入泵内，真空间压力计平时不宜与系统接通，只在读数时与系统接通，读数后立即关闭。停机前，先关闭真空容器，再旋开安全瓶活塞，放入空气后才停电，以免泵油倒流。

(c) 高度真空($10^{-3}-10^{-8}$ 毫米汞柱)：应用扩散泵。借助于汞或硅油等特殊液体的蒸发与冷凝，使空气被吸附在冷凝时形成的液滴表面，由前级泵抽出，因此扩散泵必需与前级泵联用。前级泵的作用是抽去被冷凝吸附的气体分子和造成真空，使扩散泵内液体的沸点降低、易于沸腾。其最大真空间主要决定于所用的特殊液体的性质。

高效油泵可按图 9-9 装置。用时应该注意各个系统及连接处的密封，及时换冷阱，并根据溶剂沸点，选用合适的制冷方法。

(3) 减压装置的选择：先根据溶剂的性质确定所需真空度，从而选用合适的减压装置。真空度愈高，设备愈复杂，操作也愈困难。所以用水泵如能达到要求，就不要用油泵；用普通油泵如能达到要求，就不要用扩散泵。否则不但麻烦，而且可能损失产品，甚至因抽入低沸点物质而损坏真空设备。

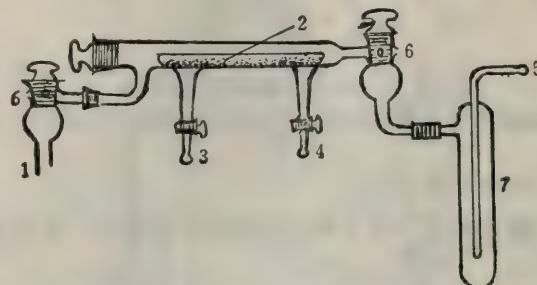


图 9-9 高效油泵装置

1. 接油泵；2. 小瓶及 P_2O_5 干燥剂；3. 接转动式麦氏真空表；
4. 备用口；5. 接蒸馏装置；6. 放气孔；7. 冷凝阱

(4) 真空度的测量——真空表的使用：

(a) 缩短的真空表和开口的 U 形管真空表：用它们（见图 9-10）测量真空度各有优缺点：前一种使用方便，但装汞和使用时易有少量空气进入汞柱顶端，导致测量不准确而需重装。后一种装汞方便但管长应超过 760 毫米，还要与大气相通才能进行比较；用汞较多且开口处汞蒸气容易逸出，较不安全。常在汞柱顶端加少量液体石蜡。这类真空计能够测出的最高真空度为 1—2 毫米汞柱。

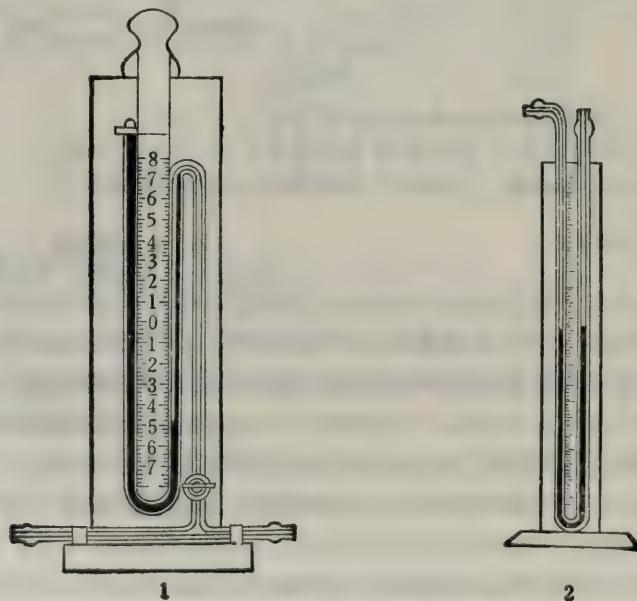


图 9-10 普通真空表

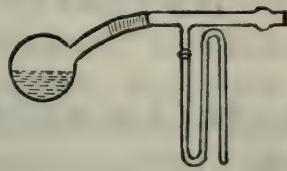


图 9-11 充汞装置



图 9-12 梅纯化

充汞法如下：先将清洁汞放在小圆底烧瓶内，然后用高效油泵抽至 10^{-1} 毫米汞柱以下，轻拍小烧瓶使汞内气泡逸出，用电吹风加热玻管使附在管壁的气体易被抽去。将汞灌入U形管后，即可停止抽气，放入空气。充汞装置见图 9-11。

如使用的汞不洁净，还需要按图 9-12 装置进行净化。净化时可用 25% HNO_3 溶液灌入管内，使汞分成细滴逐层滴下，必要时可重复洗数次、再用蒸馏水、乙醇、乙醚依次洗净干燥。

(b) 麦氏真空表：能够同时测量粗真空和高度真空。它根据波义耳定律比较开管和闭管的压力差。一种为直立式。见图 9-13 (甲) 读数前应慢慢旋开连接系统的活塞 4 和连接机械泵的三通活塞，接通管 2，使麦氏真空表系统与贮汞瓶 1 之间的压力达到平衡。再转动三通活塞，接通管 3 使它与大气相通，慢慢放入空气，加压汞面，迫使汞柱上升，直

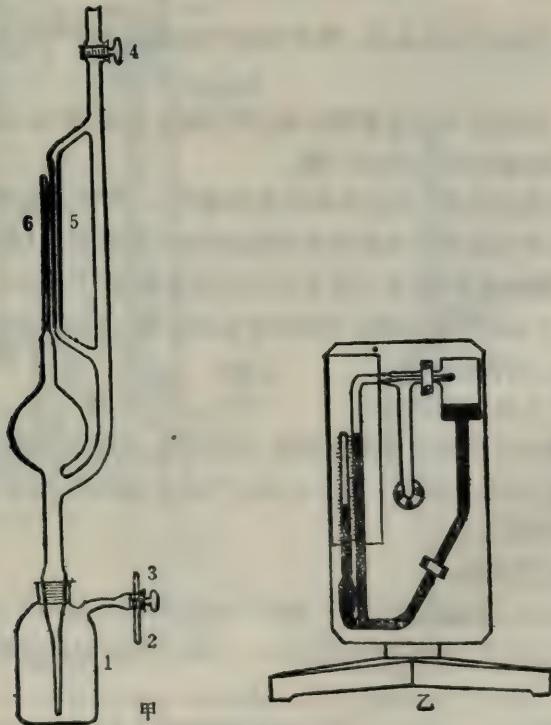


图 9-13 麦氏真空表

甲. 直立式； 乙. 转动式

至比较毛细管 5 中汞面与测定毛细管 6 的顶端相平，读出毛细管 6 汞面对应的刻度，即为系统的真空度。读数后转动三通活塞连通管 2，把上升的汞柱抽下，恢复原状。

另一种为常用的转动式，见图 9-13(乙)，易于使用。但应注意：读数前，先旋开真空系统活塞，再将表慢慢转至直立状。使比较毛细管内的汞柱准确升至零点。读数后立即把表慢慢恢复横卧状，然后关闭真空系统活塞。

(5) 减压操作的注意事项：

(a) 使用的厚壁橡皮管先在 20% NaOH 溶液中煮沸 1 小时，煮时应使管内碱液流动，煮后用蒸馏水洗数次以除去滑石粉，硫磺等杂质。

(b) 常检查橡皮塞是否漏气，如已变质应该更换。橡皮塞在蒸馏瓶上的露出部分不得少于 $1/3$ 。

(c) 防漏与涂脂：如发现真空系统漏气，可用等量的蜂蜡与松香混熔后涂封。如真空度低于 1 毫米汞柱可涂凡士林，高于 1 毫米汞柱应涂高真空活塞油。涂脂要注意均匀。

(d) 冷却系统：要在冷阱周围造成低温条件，可用冷冻机制冷或加冷却剂。常用的冷却剂有：液氮：无色液体，大气压下沸点为 -195.8°C ，可冷至 -210°C 。

干冰(固体 CO_2)：升华温度为 -78.5°C ，用时，加适量溶剂(如丙酮、乙醇、乙醚等)则冷却均匀。可冷至 -70 — -80°C 左右。

结晶氯化钙与碎冰：能达到的低温随结晶氯化钙与碎冰的比例而变，最低可冷至 -54.9°C (143 克结晶氯化钙与 100 克碎冰)。

食盐与碎冰：能达到的低温随组分比例而变，最低可达 -21.3°C (33 克食盐与 100 克碎冰)。

使用冷阱时，应先接好蒸馏系统，然后再加冷却剂以免空气中水分大量进入冷阱，降低冷阱的效率。

(e) 干燥系统：油泵前用固体氢氧化钾(钠)、氯化钙、活性炭、碱石灰等，也可以用五氧化二磷。活性炭应该放在近油泵的一端。

(f) 抗暴沸：常用毛细管(应该先检查是否通气)。蒸馏或浓缩容易氧化的物质，应由毛细管通入氮气。浓缩过程中如有固体析出，可将毛细管倒插(粗端朝下)，以免堵塞。浓缩小量液体时，可用抗暴沸管(取 4 毫米直径的玻璃管，在下端约 5 毫米处封闭)。

(g) 停止浓缩，应该先移去热源。稍冷，再关真空泵，以免浓缩物升温分解。

(h) 高真空操作，需戴防护镜。

3. 薄膜蒸发 又称薄膜浓缩。

(1) 原理：薄膜蒸发是使液体形成薄膜，增加气化表面、加速蒸发。薄膜蒸发器内有直立的加热(蒸发)管，传热面较大。液体在减压下进入加热管，把未蒸发液体拉成薄膜迅速通过管的内壁，连续蒸发。

(2) 薄膜蒸发的优点是：

(a) 液膜表面很大，传热快而均匀。液体在蒸发管内停留的时间很短(仅数秒或不足一秒)。这样即使温度略高，物料也不易破坏。可用于制备对热较稳定的酶、蛋白质和小分子物质。

(b) 蒸发管较长，液体沸腾产生的泡沫容易在管壁上部受热破裂。加热室上部安装泡沫分离器，所以也适于浓缩易产生泡沫的物料。

(3) 薄膜蒸发的缺点是操作温度较高(浓缩液温度可达60—80℃)，且液体被拉成膜状，因此不适于浓缩对热敏感的或易受薄膜切力破坏立体结构的酶与核酸等生物大分子的溶液。蒸发管难于清洗和更换，不适于浓缩粘度很大、容易析出结晶的物料。因为它们不易成膜，而且容易堵塞蒸发管。

(4) 使用薄膜蒸发时，应该控制进料速度使泡沫在气液分离器中能够全部破裂。如速度过快，液体受热不足，蒸发与分离受到妨碍。速度过慢，则气液难于分离，而易于在蒸发管中干涸，导致产品分解。此外气液分离器的直径不宜过小，以免浓缩液冲入冷凝管。

(5) 小型薄膜浓缩装置见图9-14。用时先夹紧14、13、12的螺旋夹，以水通入冷凝管5的入口处6，然后开真空泵，待气压降至500毫米汞柱以下，打开蒸汽阀并适当放出冷凝水。调节螺旋夹14使溶液缓缓沿管上升至A管的1/2高度处。减压使A管液体迅速蒸发，蒸汽充满A管并将部分液体拉成薄膜沿管壁上升。液膜迅速蒸发，大量蒸汽和少量液体的混合物通过气液分离器3。液膜破裂，液体逐滴流下进入2中即为浓缩液。绝大部分气体被抽入冷凝器5中转变为冷凝液4。浓缩液贮瓶2装满后，抽出液体检查浓度。如浓度不够可以反复浓缩。结束时先关蒸汽阀，拔掉抽气泵接头8，再关真空泵，最后关冷凝水阀。

薄膜浓缩效率很高，例如用长1米，内径2厘米的A管装成小型薄膜浓缩器，每小时可浓缩稀溶液1—2升(根据所需浓度而定)。还可按图9-15装置使提取与浓缩连续进行。

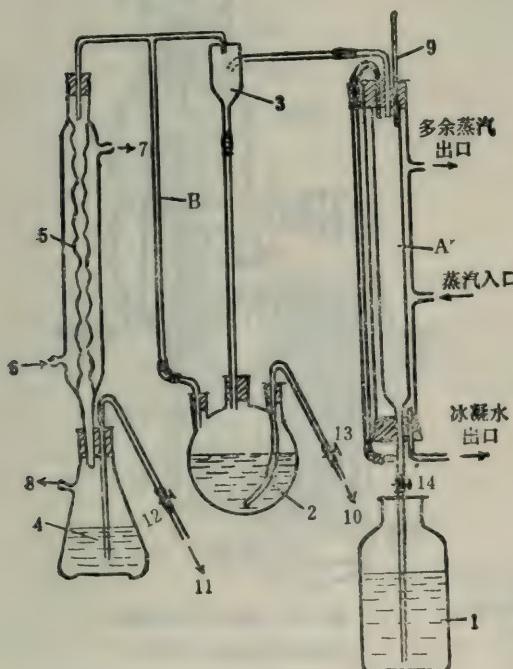


图9-14 薄膜蒸发器

- 1.待浓缩液；2.浓缩液；3.气-液体分离器；4.冷凝液；
- 5.冷凝管；6.冷水进口；7.冷水出口；8.抽气泵接头；
- 9.温度计；10.浓缩液吸出管；11.冷凝液吸出管；12、13、14.螺旋夹

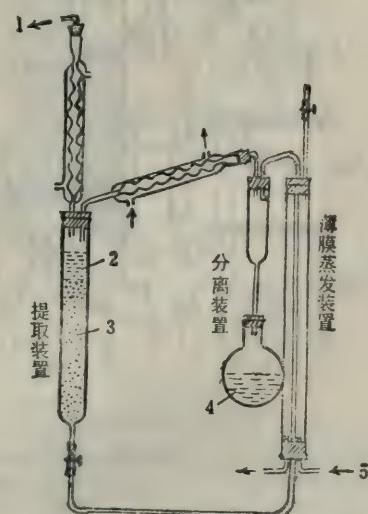


图9-15 薄膜浓缩与提取连续装置

- 1.连抽气泵；2.溶剂；3.提取物料；4.浓缩液；
- 5.蒸汽导入

(二) 工业上用的蒸发浓缩设备

原理与实验室装置相同，特点为容量大，附属设备多，结构较复杂，由于生化物质在60℃以上一般容易丧失或降低活性，常用以下减压浓缩装置：

1. 减压蒸发器 见图9-16，用时先开真空泵，抽出内部空气后，再由入口4吸入待浓缩液。继续抽气至一定真空度，由蒸汽入口5慢慢通入蒸汽、加热蒸发，同时打开废气出口8。蒸汽经隔沫装置9分出液滴后，进入冷凝器11，冷凝液流入接受器14。从观察窗3可见蒸发情况，如果液体沸腾过猛，应该稍稍打开放气阀2调节真空度。温度由温度计1显示，调节蒸汽入口5，可控制蒸发速度。停止蒸发时先关闭蒸汽入口及抽气泵，再打开放气阀2，使蒸发锅的压力恢复正常。浓缩液由出口6放出。

2. 循环减压蒸发器 装置见图9-17。

蒸发速度很快。例如容积为150升的加热蒸发器，每小时可蒸发100升浸出液。它由外加热室1和分离室2组成。加热室中蒸汽在管外加热，溶剂蒸汽由上部横管经分离室上部及附设的隔沫装置进入冷凝器冷凝后排出。液体沿循环管4回到加热室再蒸发，如此循环直至达到所需浓度。加热室的管子很长(可达7米)，沸腾管长度如果增加，循环管中液体和沸腾管中气液混合物的重量之差也增加。分离室内液体温度低、比重大，所以不断流入蒸发器(加热室)，因此产生搅拌作用加速蒸发。

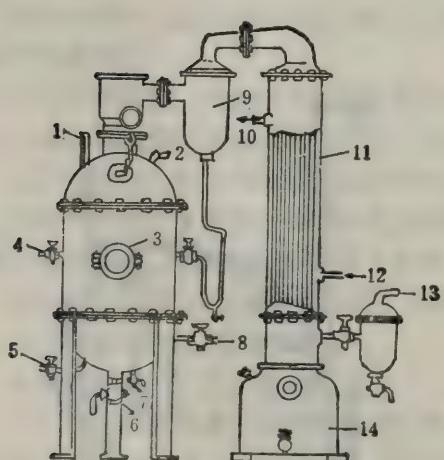


图 9-16 减压蒸发器

1. 温度计；2. 放气阀；3. 观察窗；4. 液体入口；5. 蒸汽入口；6. 浓缩液出口；7. 冷水出口；8. 废气出口；9. 隔沫装置；10. 热水出口；11. 冷凝器；12. 冷水入口；13. 连抽气机；14. 接受器

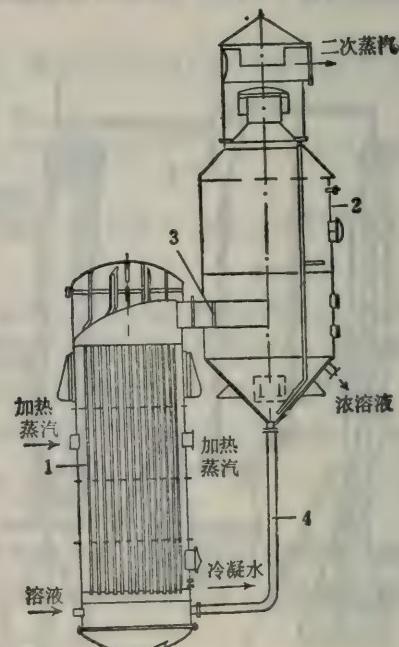


图 9-17 循环减压蒸发器

(蒸发器加热室在外面)

1. 加热室；2. 分离室；3. 气液混合管；4. 循环管

循环减压蒸发器适于浓缩易结晶、多泡沫的溶液。其优点是生产能力大，容易维护。

3. 管式薄膜蒸发器 液膜在蒸发器的管壁受热，溶剂迅速蒸发使溶液达到所需浓度。按管长可以分为长管式(管长6—8米)、短管式(管长3—4米)。按液体流向可以分

为升膜式、降膜式。它们的构造简单，便于操作，传热效率高，蒸发速度快（仅数秒至数十秒），适用于对热敏感、易发泡的物料。

(1) 升膜式蒸发器：见图 9-18，在真空下操作，蒸发管内压力小，蒸汽流速快，如进料量适当，沸腾液被蒸汽流急速携带向上，沿管壁形成薄膜，故称为升膜式。如进料过多，加热蒸汽不足，管的下部积液过多，则液柱虽然上升但不能成膜。进料过少易造成物料在管中干涸而分解。

(2) 降膜式：结构与升膜式基本相同。但液膜和蒸汽的流动方向与升膜式相反；见图 9-19。料液由顶部入；通过料液分配器被均匀地分配到每根加热管中受热而蒸发，因重力的影响增加了蒸汽的抽拉作用和液膜的流动速度，所以在同样条件下降膜蒸发器的液膜比升膜蒸发器的液膜要薄一些。而且液流的加速方向与重力方向一致使得降膜式比升膜式有更多优点，目前已被广泛采用。

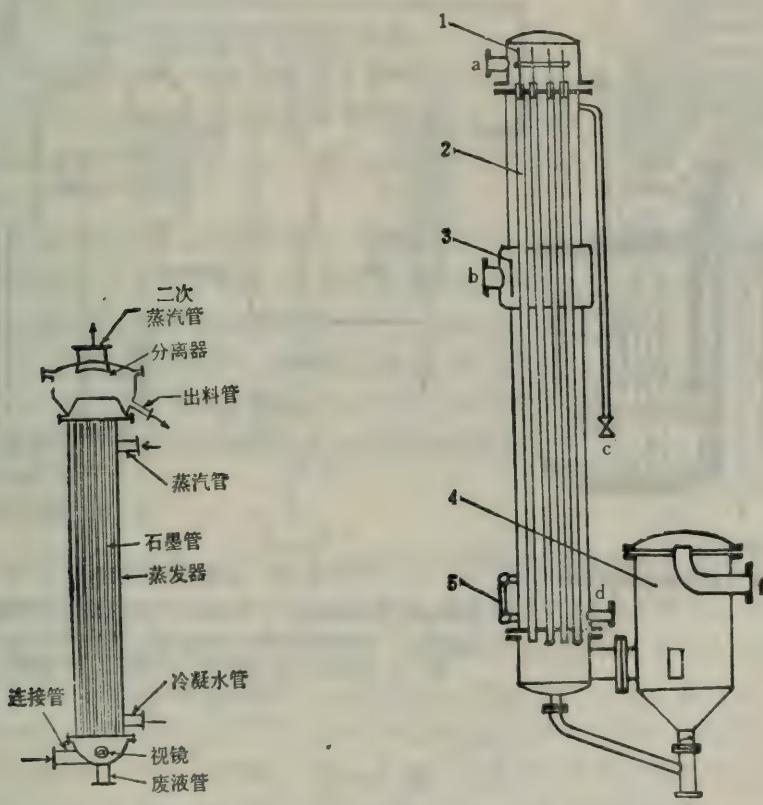


图 9-18 升膜式蒸发器

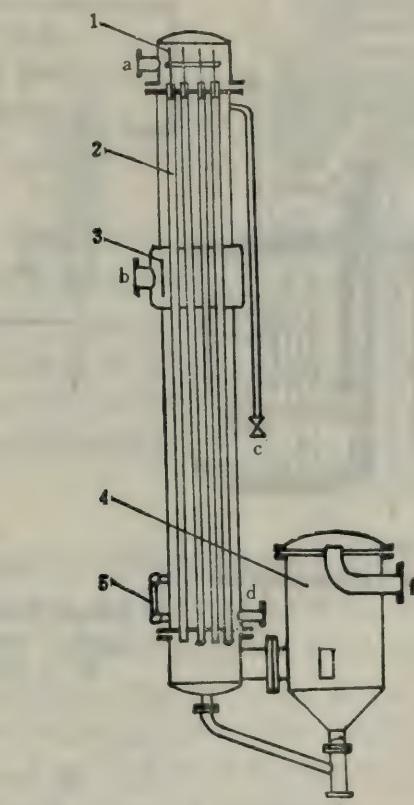


图 9-19 降膜蒸发器结构

1. 料液分配器；2. 加热列管；3. 蒸汽挡板；4. 分离器；5. 冷凝水液位计；a. 料液进口；b. 加热蒸汽进口；c. 不凝性气体排出口；d. 冷凝水出口；e. 浓缩液出口；f. 二次蒸汽出口

4. 真空离心薄膜蒸发器 利用锥形盘高速旋转产生的离心力把料液甩到锥形盘的传热面上，分散为一层极薄的均匀液膜（仅 0.1 毫米）。由于离心力的作用，液膜在蒸发面仅停留 1 秒钟。操作是在 700 毫米汞柱的真空中进行的。适于连续浓缩中度或高度热敏性及高粘度物料，见图 9-20。

真空离心薄膜蒸发器在国外已广泛用于浓缩胰岛素、葡萄糖、蛋白质、酵母等物料。例如胰岛素在40℃浓缩就会损失效价，而采用真空离心薄膜蒸发器仅在1秒钟内就能使物料达到一定的浓度，故可避免效价的损失。我国福建厦门已有生产，型号为LZ-XJ26型，加热面积为2.6米²，蒸发能力为800—900公斤水/小时，浓缩比为5—10，物料蒸发温度为45℃。

5. 大型薄膜蒸发器 为了提高薄膜蒸发器的效率，近年来多采用一种改良装置是在蒸发器处安装多条加热管图9-21所示。

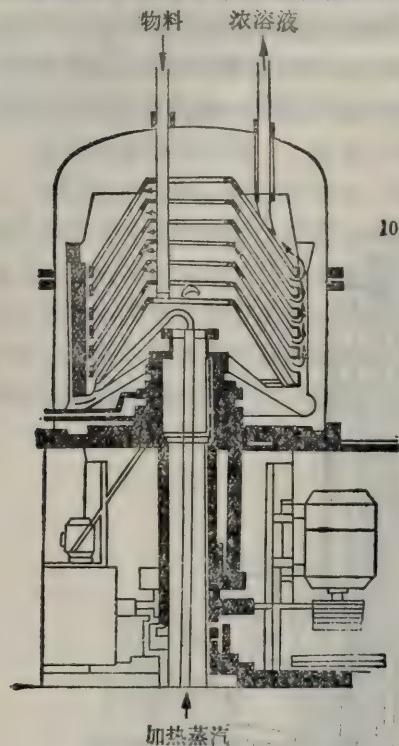


图9-20 离心薄膜蒸发器结构示意图

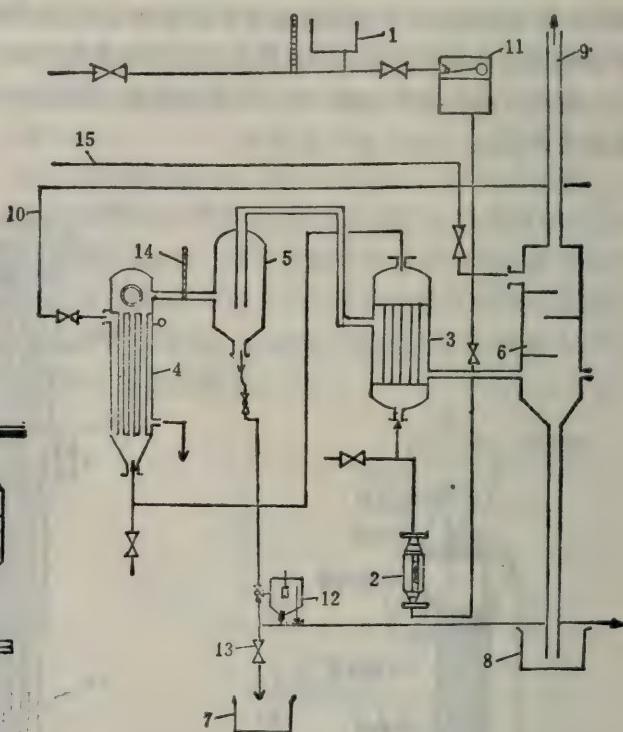


图9-21 大型薄膜蒸发器

- 1. 待浓缩液；2. 流量计；3. 预热器；4. 蒸发器；5. 气液分离器；
- 6. 冷凝器；7. 浓缩液接受器；8. 热水槽；9. 废气出口；10. 蒸汽管；
- 11. 稳压箱；12. 检验罩；13. 阀门；14. 温度计；
- 15. 冷水管

二、吸收

吸收浓缩是加入吸收剂从溶液中吸收水或溶剂使溶液达到浓缩的方法。吸收剂应具有不与溶液起反应、不吸附溶质、容易和溶液分离、除去溶剂后还能重新使用等特性。常用的吸收剂有各种凝胶、聚乙二醇、聚乙烯吡咯酮和葡聚糖等。吸收方法有用凝胶直接吸收和在半透膜外吸收两种。

(一) 用凝胶直接吸收

凝胶(例如葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶等)由多聚物组成，具有一定孔径的微孔，能

够吸水。孔径小的凝胶吸水能力弱，但速度快。孔径大的凝胶吸水能力强，但速度慢。选用适当孔径的干凝胶投入大分子溶液后，大分子不能进入凝胶网孔，仍然留在溶液中。溶剂分子及其它小分子则进入凝胶内，除去凝胶即得浓溶液。用凝胶浓缩有两种方式：动态浓缩（使稀溶液通过凝胶柱），静态浓缩（将干凝胶投入稀溶液）。

1. 使用凝胶直接吸收可用葡聚糖凝胶 Sephadex G-25、G-50，还有近年来制出的吸水性强、容易分离的聚丙烯酰胺干凝胶（Lyphogel）。

(1) 使用以前应先测定干凝胶吸水率，方法如下：在 65°C 加热 4 小时得到干凝胶。然后把一定重量的干凝胶吸水至恒重后测定重量，可用下式计算吸水率：

$$S = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \%$$

S 为吸水率；

W₁ 为干燥凝胶的重量；

W₂ 为干凝胶吸水至恒重后的重量。

根据干凝胶吸水率计算出需要加入的干凝胶量。例如 1 克 Lyphogel 吸水达到平衡时能吸收 5 克水，则 10 毫升溶液浓缩 5 倍需加 1.6 克凝胶。如使用 Sephadex G-25，其吸水率为 2.5 毫升/克干凝胶，则 3 毫升蛋白质稀溶液中加入 1 克干凝胶后蛋白质溶液可浓缩 6 倍。

将一定量的凝胶投入溶液后，凝胶开始浮于液面，不久即下沉，应放置待吸水达到平衡以后，再离心分出上层浓溶液。下层已吸水膨胀的凝胶经回收处理后可以再用。

(2) 直接加吸收剂的优点是：使用方便，吸收剂用量与吸水量成正比。浓缩时溶液中盐类和水分同样进入吸收剂，浓缩前后溶液 pH 及离子强度无变化。有的吸收剂甚至在高压灭菌后性能也不改变，可以对溶液进行无菌浓缩。

缺点是吸收剂表面有时粘附一部分溶液造成损失。

(二) 在半透膜外吸收

即高渗透析。半透膜能使小分子或离子透过而蛋白质等大分子不能透过。半透膜袋的外面如果有浓度很高的、能够吸水的高聚物，膜外渗透压就高于膜内。膜内溶液中的水向膜外扩散，立即被高聚物吸收直至平衡。反复操作就能得到所需的浓溶液。常用的吸水高聚物有聚乙烯吡咯酮 (polyvinyl pyrrolidone，简称 PVP，分子量 12,000)，聚乙二醇 (polyethylene，简称 PEG，分子量 5000—10,000 适于浓缩，6000 最好) 及葡聚糖等。使用前常需加碱中和 PEG 中的酸。用过的 PVP、葡聚糖等经过加热或吹风去水后可以再用。但是 PEG 不能加热干燥，因为加热使它转变为无用的蜡状物。

此法的缺点是：吸收剂中如果含有分子量较低的聚合物或杂质，就有可能透入袋内；有些物质如聚乙烯吡咯酮对 280 毫微米波长有吸收，因而对测定蛋白质有干扰。蛋白质不能全部回收，因为半透膜有吸附作用。

三、膜浓缩

膜分离方法在本书已有介绍。这里简单介绍实验室用的浓缩装置。

(一) 减压透析

1. 基本原理是利用浓缩装置内外的压力差，将样品中的溶剂挤压出去，使样品得到浓缩。例如在图 9-22 所示的装置中，火棉胶袋的容量为 8 毫升，透水速度为 7—15 毫升/小时，可以反复用十几次。火棉胶袋装液后，置于吸滤瓶内进行真空吸滤，直至袋内高分子溶液达到所需浓度为止。

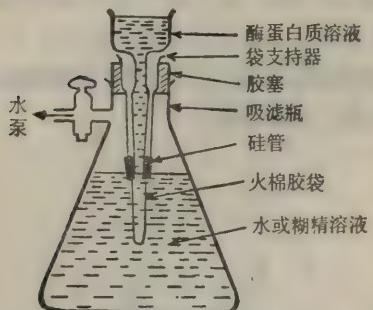


图 9-22 减压透析

如无低温工作室又不愿继续使用水泵，可以在室温减压后关闭吸滤瓶出口，置于冷处。吸滤压力不宜过大，否则引起滤孔堵塞，反而延长长时间。取出浓缩液时为了不损伤膜和减少样品损失，可以用细胶管套在吸管（或注射器）上轻轻擦吸膜面。为了防止透析袋干燥或长霉，可保存于 25% 乙醇中。

2. 微量蛋白质减压透析浓缩器，见图 9-23。操作时透析液处于大气压下。利用膜面的压力差能够有效地进行浓缩。透析液内有垂直的管状透析膜。膜内的

杆有三种作用：

(1) 增加单位体积样液的膜面积。

(2) 透析时使分子移动的距离减少至 1.5 厘米左右，基本上是薄层透析；(3) 能够精确地预定浓缩的最终体积。

微量蛋白质浓缩器用水泵（或真空泵）抽真空后，用夹子夹住，停止抽气，可以在一定的温度条件下进行浓缩。加样液后透析浓缩立即开始，样液弯月面下降直至样液贮存室的尖端。这时样液与蛋白质透析膜脱离接触，透析液的浓缩就自动停止。因此样液不会浓缩至干。可以自动使样液体积最终定量地小至 25 微升。

透析膜如不垂直，重力使被截留的蛋白质分子沉淀在膜上。膜的吸附作用使蛋白质变性、活力受损失，而且产生浓差极化。搅拌虽然可以使蛋白质分子离开膜，但又产生有害的切变作用。该装置中透析膜是垂直的，能消除上述有害作用而保留重力的有效作用。浓缩时被截留的分子直接沉淀到透析膜底部已经硅酮化的样液贮存器中。这些改进使回收率平均达到 90%，而且不损害蛋白质的酶活性或生物活性。

国外有多种这类装置。它们还能与高压消毒装置连用。浓缩达到的预定体积为 15 微升至 1000 微升。

(二) 离心超滤

含生物大分子的少量样液可在离心管内借助于离心力进行超滤，如图 9-24，用小圆

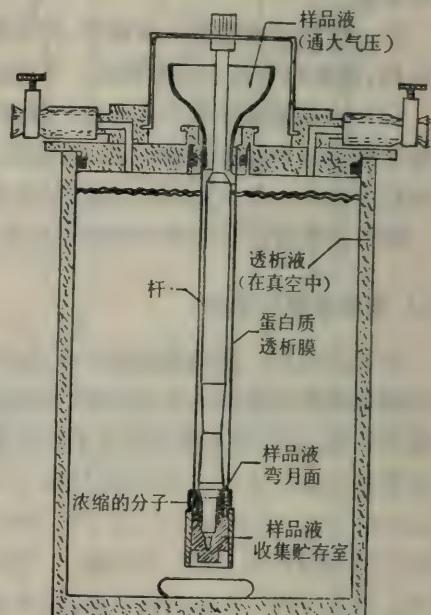


图 9-23 微量浓缩器

筒插入离心管上的活塞，使圆锥形亲水凝胶膜固定在圆锥形支架上。膜内装有样液，离心2—30分钟，部分溶剂和小分子杂质透过膜，成为超滤液。含有大分子的样液得到浓缩。

(三) 加压膜浓缩

包括加压超滤装置、空心纤维浓缩器、微孔膜过滤器及反渗透膜过滤装置等，已大量用于分离与浓缩生化产品。加压膜浓缩不仅效率极高，还有以下优点：

(1) 条件温和：与蒸发、冻干、沉淀等方法比较，此法没有相的变化，保持原来的pH和离子强度，可以在低温操作，能较好地保持生物大分子的活性，因此广泛用于浓缩生物大分子的稀溶液，特别适于浓缩不稳定的酶液。

(2) 不需要添加化学试剂，设备简单、费用较低，操作方便且能较快地处理大量的稀溶液。

(3) 蛋白质和酶的溶液可以浓缩到10—50%浓度，回收率高达90%。

(4) 有纯化作用，可以同时脱盐及除去其它小分子杂质。

缺点是不能直接得到干品。膜的吸附作用会造成一定的损失。

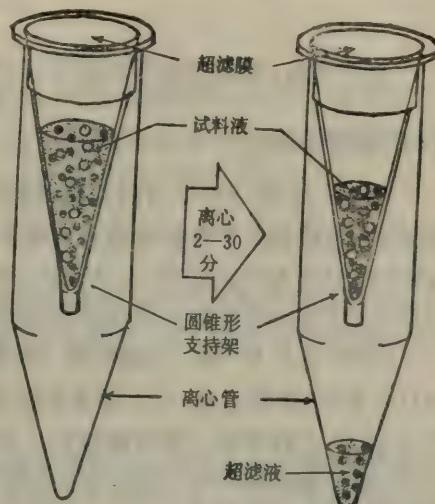


图 9-24 离心超滤

四、冰冻融化

冰冻融化是浓缩生物大分子及其它物质的一种有效方法，能用于浓缩大量溶液。样液在缓慢冻结时，水不断形成冰晶而析出，盐类及大分子留在液相，从而得到浓溶液。其装置如图9-25所示，浓缩室的中央有浮动式搅拌器。溶液中的水在浓缩室的周围逐渐结冰，溶质浓度不断增大，集中到浓缩室的中部。可以使溶液浓缩4—30倍。

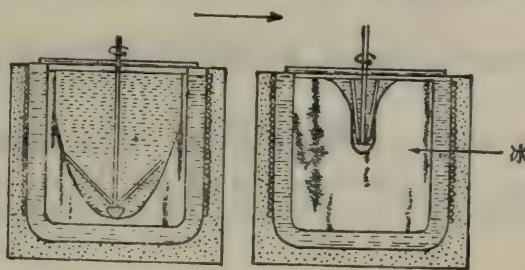


图 9-25 冰冻浓缩装置

也可以利用溶剂与溶质融点的不同，先将溶液冻成固体，然后缓慢融化。用此法浓缩蛋白质和酶的盐溶液时，不含蛋白质和酶的冰块浮在液面上，而蛋白质和酶则集中于下层溶液。移去上层冰块，可以得到蛋白质和酶的浓溶液。

五、其 他

离子交换，吸附剂吸附和亲和层析方法都同时具有分离和浓缩的作用。

(一) 离子交换

例如：水解 RNA 可以得到四种单核苷酸的混合液。经阳离子交换树脂分离 AMP 组份后，再经阴离子交换树脂分离能够得到 GMP、UMP 及 CMP 组分。经阳柱得到的 AMP 组分所含的杂质很少，可以进行减压浓缩。而 CMP、GMP、UMP 组分中存在较多色素，减压浓缩将使产品颜色加深，故宜再用阴柱浓缩。其过程如下：

CMP 组分用 6N NaOH 调 pH 8.0—8.5，UMP 组分调 pH 9.0—9.5，GMP 组分调 pH 7.0 上柱（聚苯乙烯-二乙烯苯季胺型树脂，100—200 目，交联度 1×8）。100 毫升树脂可上柱 10 克核苷酸（吸附越饱和，浓缩效果越好）。上柱后用 0.1NHCl (pH 1.0)，3% NaCl 溶液加热至 50℃ 洗脱，分部收集，用 10 倍量的 95% 乙醇沉淀核苷酸。可浓缩 50—100 倍，收率在 80% 以上。

(二) 吸附剂吸附

常用的吸附剂有活性炭、磷酸钙、氧化铝与硅胶等。溶剂的极性和溶解性对吸附作用有很大的影响，所以考虑吸附作用时应注意两个方面：被吸附物的极性和溶剂的溶解性。

亲和层析与有选择地加沉淀剂常用于分离，但同时也起到极好的浓缩作用。其原理及操作前已介绍，这里不再赘述。

第二节 干 燥^[1-5, 11-18]

干燥是将潮湿的固体、膏状物、浓缩液及液体中的水或溶剂除尽的过程。

生化制备中干燥往往是最后一道工序。生化产品含水容易引起分解变性、影响质量。

干燥的目的是提高产品的稳定性，使它符合规定的标准，便于分析、研究、应用和保存。

物料含水量与空气湿度之间存在着动态平衡。未经密封的物料不能保持干燥，因为空气中就含有水蒸气。要使物料干燥或含水量低于空气湿度，就应放入密封容器内进行干燥。

一、影响干燥的因素

(一) 蒸发面积

干燥过程中，水或溶剂从物料表面蒸发。干燥效率与蒸发面积成正比，蒸发面积大，有利于干燥。如果物料厚度增加，蒸发面积减小，不仅难于干燥。还可能因温度升高而引

起物料部分溶解、结块，甚至变质。

(二) 干燥速度

干燥过程先是表面蒸发，然后内部的水分子扩散至表面，继续蒸发。如果干燥速度过快，表面水份很快蒸发，就使得表面形成的固体微粒互相紧密粘结，甚至成壳，妨碍内部水份扩散至表面。所以应根据表面蒸发的情况对干燥速度进行适当控制。

(三) 物料所处的状态

静态时蒸发面积最小，蒸发效率很低，需要有充分的时间使内部水份扩散到表面，才能完全干燥。如用气流连续吹过含水的固体物料使之分散跳动，可以提高干燥效率。

(四) 温度

升温能使蒸发速度加快，蒸发量加大，空间相对湿度降低，从而有利于干燥。但很多生化物质不耐热，所以干燥的温度不能高。对于需在低温下进行干燥的样品说来，冷冻干燥较为适宜。

(五) 湿度

物料所处空间的相对湿度越低，越有利于干燥。相对湿度如果达到饱和，则蒸发停止，也就无法进行干燥。降低相对湿度的办法如下：

1. 可以在干燥器内放入干燥剂吸水。
2. 使气体流动更新，如采用鼓风干燥箱和烘房，利用气流降低相对湿度。而在喷雾干燥时，相对湿度决定于高压气流的相对湿度。如果降低气流的相对湿度（例如用干燥剂先吸去气流中的水份），干燥效果更为理想。

(六) 压力

蒸发速度与压力成反比，减压能够有效地加快蒸发的速度。还能降低干燥的温度，并使产品变得疏松。

了解上述因素将有助于选择和改进干燥方法。

二、常压吸收干燥

常压干燥是在密闭空间内用干燥剂吸收水或溶剂。此法的关键是选用合适的干燥剂。

1. 干燥剂分类 按照脱水方式可以分为三类：

(1) 能够与水可逆地结合为水合物。例如无水氯化钙、无水硫酸钠、无水硫酸钙、固体氢氧化钾（或钠）等。这类干燥剂不能完全除去水，因为它们与被干燥物之间存在着水分的平衡。

(2) 能够与水作用生成新的化合物，例如五氧化二磷、氧化钙等。

(3) 能够吸去微量的水及溶剂，例如分子筛。

2. 选用干燥剂除考虑效率外，还有以下的要求 (1) 不与被干燥物发生化学反应(例如水解、酸碱中和或生成分子化合物等); (2) 不溶于被干燥物; (3) 对被干燥物没有催化作用; (4) 干燥速度快，吸水量大，价格合适。

3. 常用的干燥剂及其性能 (1) 无水硫酸钠 (Na_2SO_4)，中性、价廉、吸水量大，但作用慢、效力差。 Na_2SO_4 在 32.4°C 以下吸水后形成 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ，但超过该温度以后，这种水合物即不稳定。

(2) 无水硫酸镁 (MgSO_4)，中性，效力中等、作用快、吸水量也大，吸水后形成 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，与有机物不发生反应。

(3) 无水硫酸钙 (CaSO_4)，作用快、效率高。与有机物不发生反应，而且不溶于有机溶剂。与水形成稳定的水合物 ($2\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)， 25°C 时蒸气压为 0.004 毫米汞柱。缺点是吸水量小(仅为重量的 6.6%)。可用于进一步干燥(在无水硫酸钠、无水硫酸镁吸水后使用)。

(4) 固体氢氧化钾(或钠)，可吸收水、氨和胺类。氢氧化钾吸水能力比氢氧化钠大 60—80 倍。

(5) 五氧化二磷 (P_2O_5)，吸水、效力最高、作用非常快，但是价格较贵。

(6) 氧化钙 (CaO)，即生石灰，碱性，吸水后成为不溶的氢氧化物、价廉。

(7) 分子筛：常用的是沸石分子筛。它们是含铝硅酸盐的结晶，有以下几种：

(a) A型，又可分为：

3A型： $\text{K}_9\text{Na}_3[(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12}] \cdot 27\text{H}_2\text{O}$

4A型： $\text{Na}_{12}[(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12}] \cdot 27\text{H}_2\text{O}$

5A型： $\text{Ca}_{45}\text{Na}_3[(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12}] \cdot 30\text{H}_2\text{O}$

(b) X型

13X型： $\text{Na}_{86}[(\text{AlO}_2)_{86}(\text{SiO}_2)_{106}] \cdot x\text{H}_2\text{O}$

分子筛有高度的选择吸附能力，可依据它们的孔径不同而筛分不同大小分子的混合物。分子筛用前应在 $550 \pm 10^\circ\text{C}$ 活化脱水，温度过低影响吸附量。温度超过 600°C 则使晶体结构遭到破坏，导致降低或丧失吸附能力。分子筛活化后冷至 200°C ，应立即取出存

表 9-1 分子筛的吸附性能

类型	孔 径 (埃)	吸 附 情 况	
		能 吸 附	不能吸附
3A	3.2—3.3	$\text{N}_2, \text{O}_2, \text{H}_2, \text{H}_2\text{O}$	CO_2, NH_3 及更大的分子
4A	4.2—4.7	$\text{CH}_3\text{OH}, \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}, \text{CH}_3\text{CN}$ $\text{CH}_3\text{NH}_2, \text{CH}_3\text{Cl}, \text{CO}_2, \text{CS}_2$ $\text{CO}, \text{NH}_3, \text{CH}_4, \text{C}_2\text{H}_6$ 以及能被 3A 吸附的物质	
5A	4.9—5.5	$(\text{C}_3-\text{C}_{14})$ 正构烷烃 $\text{C}_2\text{H}_5\text{Cl}$ $(\text{CH}_3)_2\text{NH}, \text{C}_2\text{H}_5\text{Cl}, \text{CH}_3\text{Cl}$ 以及能被 3A、4A 吸附的物质	$n(\text{C}_4\text{H}_9)_3\text{NH}$ 及更大的分子
13X	9—10	小于 10 埃的各种分子	$(\text{C}_4\text{H}_9)_3\text{N}$

放干燥器内备用。分子筛用后活性降低，需用水蒸汽或惰性气体把吸附的物质置换出来，再进行活化脱水。

分子筛适于吸除微量水份，如果样品水分过多应先用其它干燥剂吸水，再用分子筛进行干燥。几种分子筛的吸附性能如表 9-1。

三、真空干燥

(一) 原理

真空干燥即减压干燥，与减压浓缩原理相同。

(二) 装置

包括真空干燥器、冷凝管及真空泵。干燥器顶部经活塞接通冷凝管。冷凝管的另一端顺序连接吸滤瓶、干燥塔和真空泵。蒸气在冷凝管中凝聚后滴入吸滤瓶中。干燥器内放有干燥剂可以干燥和保存样品。

实验室中常用的装置有：

1. 真空干燥器

(1) 使用时真空度不宜过高，抽气至盖子推不动即可，以免干燥器被压碎。新的干燥器一般需经耐压试验。处理危险或有毒物品时，干燥器外还应罩铁丝网或用布包扎。打开干燥器取样时放入空气不宜太快，应缓缓旋开活塞。在通气口放一小片清洁滤纸，也能减缓气流，避免冲散样品。

(2) 选用合适的干燥剂：常用的干燥剂及其作用见表 9-2。

表 9-2 常用干燥剂及其作用

干燥剂	吸收的溶剂或其它杂质
无水 Na_2SO_4 、 MgSO_4 、 CaSO_4 、硅胶	水
CaO	水、乙酸、氯化氢
KOH 、 NaOH	水、乙酸、氯化氢、酚、醇
无水 CaCl_2 、 P_2O_5 、石蜡刨片	水、醇 醇、醚、石油醚、苯、甲苯、氯仿、四氯化碳

(3) 待干燥物所含溶剂如不止一种时，可在干燥器内同时放两种干燥剂（例如无水氯化钙和硅胶，氧化钙与五氧化二磷、石蜡与氢氧化钠等）。不应同时放两种效率相差很大而又吸收相同溶剂的干燥剂（如五氧化二磷和氯化钙）。因为这时低效的氯化钙不能起作用。必要时可以分两次进行干燥，即先用低效的氯化钙吸除大部分水再用高效的五氧化二磷将水除尽。

2. 真空干燥箱 可以调控温度。用时需连接冷凝器和真空泵。它能处理较大量的样品，但是被干燥物的加量应该适当，以免液体起泡溢出容器，造成损失和污染真空干燥箱。

四、冷冻干燥

(一) 概述

冷冻干燥 (Lyophilization)，是先将溶液或混悬液冷冻成固态，然后在低温和高真空度下使冰升华，留下干物。冷冻干燥的原理可用溶剂的三相点相图来说明，见图 9-26。图中 OA 是固液曲线，OB 是汽液曲线，OC 是固汽曲线，O 为三相点。当温度在三相点 O 以下时将压力降至 OC 线以下，溶剂就可以由固相直接升华为汽相。例如，冰的蒸气压在 -40°C 时为 0.1 毫米汞柱，在 -60°C 时为 0.01 毫米汞柱，如将 -40°C 冰上的气压降到 0.01 毫米汞柱，固态的冰就吸收大量的热 (1 克 0°C 的冰变成 0°C 的蒸汽需吸热 580 千卡) 直接升华为水蒸气。故升华可以使冻结的溶液逐渐脱水而留下溶质干粉。

图 9-26 三相点相图

因为冰冻干燥是在低温高真空度下进行的，所以样品不起泡、不暴沸。干物不粘壁、易取出，而且成为疏松的粉块，极易溶于水。由于冰冻干燥有上述优点，所以广泛用于科研和生产，适于对热敏感、易吸湿、易氧化及溶剂蒸发时易产生泡沫而引起变性的制品(蛋白质、酶、核酸、抗生素、激素等)。但并非所有的生化物质都能在冻干时稳定。应该先用小量做试验，确证冻干对该种物质无害以后再进行大量处理。

(二) 装置

核心部件是具有足够抽气容量的真空泵。为了保持泵的效率，防止蒸气进入泵内，在泵前应该有吸收蒸气的装置，内装干燥剂 (如 P_2O_5 和 KOH) 用以吸水。冷阱也是整个装置的主要部件。冷阱外围可用化学制冷或机械制冷。真空测量装置可用水银真空表或麦氏真空表。

1. 实验室制备冻干品的简易方法

(1) 将物料置培养皿内 (厚度不超过 1 厘米)，在冰箱内冻成硬块 (有些物料需在深度低温下迅速冻硬)。准备真空干燥器，内置两个培养皿分别放固体 KOH (或 NaOH) 及

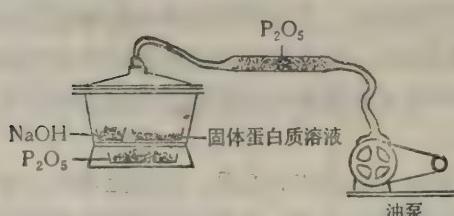


图 9-27 实验室冻干装置 (1)

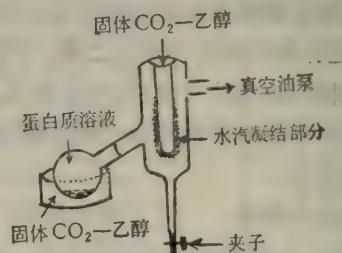


图 9-28 实验室冻干装置 (2)

P_2O_5 ，迅速取出冻块放入干燥器，干燥器通过装有 P_2O_5 的干燥管与真空泵相连，管中要有足量的 P_2O_5 ，两端塞棉花，注意切勿使 P_2O_5 和水进入油泵。抽真空后，经过 5—10 小时可得冻干品，见图 9-27。

(2) 物料置圆底烧瓶中，将瓶浸入干冰-乙醇混合物内，使瓶内物迅速冻成硬块，然后连接高真空度的真空泵，见图 9-28。连接泵的管道口径不宜太小，否则降低冻干效率，减压时加温可以加速蒸发。但以不使试料解冻为限，烧瓶外面通常蒙霜。如果霜层开始融化、冻块起泡应即停止。检查和排除故障后将试料重新冻结，继续冻干。如果霜层全部融化，用手接触烧瓶不感觉冷，就表明升华已经停止。但可能还有冰残存于物料内部，因此需适当升温或延长抽真空时间以彻底脱水。

(3) 半微量冻干：简便易行，效率较高。冻干 30 毫升以下水溶液仅需 2—3 小时。其装置见图 9-29。它由 A 与 B 两部分组成，A 用于冷却与贮存抽出的溶剂，支管 C 与 A 相切连接。D 为真空活塞。E 为盛放样液的容器。F 为盛放制冷剂的保温瓶，其中放干冰-丙酮混合物或冰盐混合物或液氮等冷却剂。

使用时先将溶液置 E 中，用冰-盐浴或丙酮-干冰浴冷至固态。E 经活塞 D 与真空泵联接。开动真空泵(可以用 2X-1 型旋片式真空泵)以后，旋开活塞 D。E 中冻块内的溶剂升华，由支管 C 切向进入并沿螺旋线通过 A，F 的冷却作用使溶剂蒸气沿 A 的周壁凝聚。15 分钟后关闭 D，数小时后 E 中溶剂全部升华至 A，旋开 D、放入空气或氮气，E 中留下冻干品。

几点说明：

(a) 如果装置密闭，待真空度恒定以后就可关闭活塞 D，再停真空泵。冷浴 F 需维持低温(-80°C — -20°C)，以保证继续冻干。此时系统内真空度等于该种冷浴的温度条件下 E 中溶剂的饱和蒸气压。

(b) 待冻干物中如果混有少量低凝点溶剂(丙酮、甲醇、乙酸乙酯等)，则需重复以下操作：

先冷却 E 使内容物冻固，然后打开 D 抽真空，待真空度恒定以后关闭 D 使 E 升到室温，再冷却 E，反复操作 2—3 次，可除去混杂的溶剂，否则样品不易冻干。

(c) 冻干速度与冷阱 A 的温度有关。A 与 E 的温差越大，冻干效率越高。例如要将 20 毫升某物质的水溶液冻干，F 处用干冰-丙酮混合物制冷(约 -60°C)只需 2—3 小时；如用冰盐混合物制冷(约 -15°C)，则需 8 小时。

(d) 各种溶液冻干效率还受该溶剂的汽化热等因素影响。汽化热越小，冻干效率越高。例如，20 毫升某物质的苯溶液，用干冰-丙酮制冷，1 小时即冻干(苯的汽化热比水小)。

2. 旋转冷冻离心式冻干机 (Spin-Freeze Centrifugal Freeze Dryer) 用这种装置可以冻干小量的样品而无需制冷设备。该装置与真空泵相连，高速旋转中的样品上面的压力降低导致迅速蒸发。利用蒸发的冷却作用可以使样品降温直至冻结。在常用的冻干

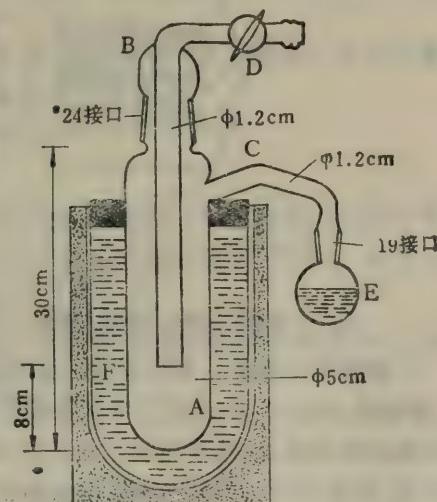


图 9-29 半微量冷冻干燥装置结构简图

机中,如果使样品上面的压力降低就会引起沸腾和起泡,导致损失样品。然而旋转冷冻装置利用离心力可以防止起泡而使样品的损失最少。

旋转产生的离心力(大于重力五倍以上)还有一个好处就是能够迫使部分样品沿管壁升高,从而减少样品的厚度、增加表面积。并不需要在整个冻干过程中连续旋转。冻干装置中的定时器可以控制旋转时间,样品冻结后转子停止旋转而冻干过程仍继续进行。

3. 高效能多用途的实验室多用冰冻干燥机 LG-3 型实验室多用冰冻干燥机采用自动控制技术,操作方便。它是在小型半导体内冷式冻干器的基础上改进设计的,用于冰冻干燥的最大试样量可以达到 500 毫升(12—18 小时内干燥,用 13A 型分子筛干燥剂,可以再生)此外还能用于:(1)室温真空干燥;(2)升温真空干燥(在 -30°—+50°C 范围内无极可调);(3)低温冷藏(容积 50 升,最低 -25°C);(4)真空低温贮存;(5)充氮低温贮存。

4. 大型冻干装置 示意图见图 9-30。

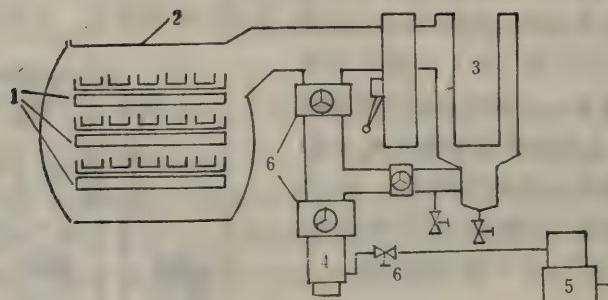


图 9-30 大型冻干装置示意图

1. 装待干燥物; 2. 真空干燥箱; 3. 冷凝器; 4. 增压泵; 5. 前级泵; 6. 隔离阀

一般由制冷系统、真空系统、加热系统和电器仪表控制系统组成。主要部件为干燥箱、凝结器、冷冻机组、真空泵组和加热装置等。制品的冻干在干燥箱中进行。箱内搁板可用铸铝板制成,冷管及热管浇注其中,分别用于冷却或加热制品。凝结器内装螺旋状冷气盘管,使其工作温度低于干燥箱内制品的温度(可达 60°C)。机械泵(旋片式真空泵)与增压泵(罗茨真空泵)串接,用以抽空真空系统。制冷系统的冷冻机并联使用,根据负荷情况可以只开一台也可同时开二台或三台。加热装置由油泵、油箱、电加热器等组成循环管路。控制台控制全机的电动仪表。利用铂热电阻与动圈式温度指示仪对干燥箱中各层的板温、制品温度、油温及凝结器温度进行遥测。电阻真空计能够测量气体的全压,并具有反应时间快和适于遥测等优点已在冻干机中广泛应用。例如我国 LZG-40 型冷冻干燥机就是采用电阻真空计的。

(三) 冻干注意事项

1. 样品溶液

(1) 样品最好溶于水,不含有机溶剂,因为有机溶剂降低冰点,使冻块易融。蛋白质和酶溶液的冻块融化后再经减压则引起大量泡沫导致变性。而且低沸点溶剂(乙醇或丙酮)的蒸气压相当高,不易凝结;大部分蒸气将经过冷阱进入泵内,冷凝于泵油中,使泵油

稀释将损害真空泵。如果冻块仅含少量有机溶剂可按前述操作除去。

(2) 盐浓度的影响：盐浓度高，冻块也易融化，影响样品活性及延长干燥时间。解决方法是先将样品溶液脱盐，或使用挥发性盐(碳酸铵或碳酸氢铵)缓冲液。

(3) pH 值的影响：缓冲液冻结时 pH 可能有很大改变，例如 pH7.0 的磷酸缓冲液冷冻时，磷酸氢二钠比磷酸二氢钠先结晶析出。溶液 pH 在完全冻结前接近 3.5。使用 pH7.0 的磷酸钾缓冲液时结果恰恰相反，因为磷酸二氢钾比磷酸氢二钾的溶解度小，溶液 pH 最终可以达到 7.5—8.0。溶液冻结愈快，pH 变动愈少。挥发性盐(碳酸铵或碳酸氢铵)缓冲液冻干时，pH 同样可能改变。因此某些物质(如羧基肽酶、过氧化氢酶、脂蛋白等)因 pH 改变或低温影响可能变性失活，需加入适当的稳定剂(如糖类、Ca²⁺ 等)。

(4) 溶液的浓度应该适当，蛋白质浓度最好不低于 1.5%。同批冻干的溶液浓度相差也不应过大。

2. 装样容器

(1) 在高度真空条件下应该能够耐受外压并且传热良好。常用圆底烧瓶、玻璃安瓿和青霉素瓶。加液量不应超过容器有效体积的 1/5。样品过多，将使冷阱积存厚冰，影响传热，并延长冻干时间。

(2) 冻干稀溶液通常得到很轻的绒毛状物，容易飞散，被蒸气带入冷阱。在装样容器上面扎一层细的尼龙网能够截留冻干物，而且不影响冻干速度。

(3) 用皿或盘盛放样品使之形成薄层，较易冻干。

3. 溶液冷冻

(1) 骤冷冻结(温度低于 -20℃)可以使晶粒细小、冻块均匀。实验室通常采用静冻法，干冰-乙醇冷浴的液面应该高于样品液面。样液冻成白色不透明时即可。如果用小管或安瓿，预冻后可以用多接头管连接冷阱，见图 9-31。

(2) 旋冻法可以加速冻干。在圆底瓶中放入少量样液，将瓶倾斜浸在冷却剂(干冰-乙醇混合物)中。边冻边旋转直至形成薄层硬块。

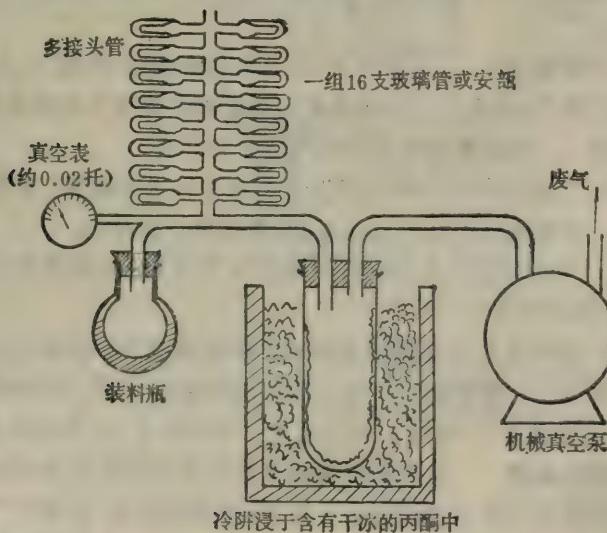


图 9-31 实验室规模的冻干器

4. 冻干条件及操作注意事项

(1) 在冰全部升华以前不要扰动样液冻块。在除去瓶壁冰壳或移动容器时，应避免水蒸气流量突然增加导致冲散样品。

(2) 达到一定真空度后，冻块中水分升华、温度降低，可使冻块自然保持冻结状态。这时容器外面无需冷却、甚至还需适当加温以补充升华时被消耗的热量。

(3) 冻干过程中，容器外壁通常结霜，这表明系统运转良好。将近结束时，外壁的霜渐渐消失。为了除尽水份，应适当延长时间。

(4) 结束时，缓慢放入空气，避免急速的气流冲散冻干品。系统内部的压力升至大气压后，取出装样容器，关闭真空泵。最后关冷冻机或移去冷阱（上述次序不能颠倒）。如果在放入空气以前停真空泵，泵油将倒流至冷阱，甚至可能进入干燥器，污染样品。为了预防水蒸气进入真空泵，要在停真空泵以后才停止冷却。

(5) 冻干品可以移入小瓶，用蜡密封，如果是安瓿，可用扁平火焰熔封，保存于冰箱内。

(6) 真空泵是冻干装置的主件。应注意维护，经常换油。常用的泵至少每月换一次油。如果发现水、有机溶剂或酸进入泵内，即需换油。

五、喷雾干燥

喷雾干燥是将料液（含水 50% 以上的溶液、悬浮液、浆状液等）喷成雾滴分散于热气流中，使水分迅速蒸发而成为粉粒状干燥制品。

喷雾干燥的效果决定于雾滴大小。雾滴直径为 10 微米左右时，每升液体形成的液滴数可以达到 1.92×10^{12} ，总面积可以达到 600 米²，通常雾滴直径在 10—50 微米之间，表面极大，蒸发极快、干燥时间很短（数秒至数十秒）。水份蒸发带走热量还能使液滴与周围的气温迅速降低。因此可以在常压下干燥热敏物料。改变操作条件还可以调控产品的粒度及含水量，并且可以制成空心微球状产品，易于溶解。因而广泛用于制备粗酶制剂、抗生素及活性干酵母。

但这种方法的干燥能力小、占地面积大，而且成品密度低、粒度小，在收集和除尘方面要求较高。物料需经雾化，不适用于对切力及对热敏感的具有生物活性的大分子。

1. 雾化器的类型 按液滴雾化的方式可以分为三种：

(1) 机械喷雾：用高压（50—200 大气压）泵将物料送进喷嘴，由喷嘴高速喷出均匀雾滴。喷距约 1 米。喷嘴直径约 0.5—1.5 毫米，不适用于悬浮液。

(2) 气流喷雾：利用压强 1.5—5 公斤/厘米²（表压）的压缩空气经气流喷雾器使液体喷成雾滴，适用于各种料液。

(3) 离心喷雾：将料液注于急速的水平旋转的喷洒盘上，借离心力使料液沿喷洒盘的沟道散布到盘的边缘，分散成雾滴，离心喷洒盘转速为 4000—20,000 转/分，周速达 100—160 米/秒，喷距直径为 2—3 米。此法适用于各种料液，但功率消耗较大。

2. 喷雾干燥装置的类型 按气流与雾滴运动的方向可以分为并流、逆流与混合流。并流使雾滴运动的方向与气流运动的方向一致，产品不致过热，应用较广，见图 9-32。

3. 喷雾干燥装置 包括：(1)喷雾室，(2)液体喷洒装置，(3)加热空气并且将它送

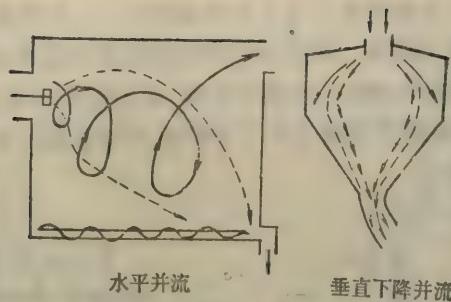


图 9-32 并流干燥装置

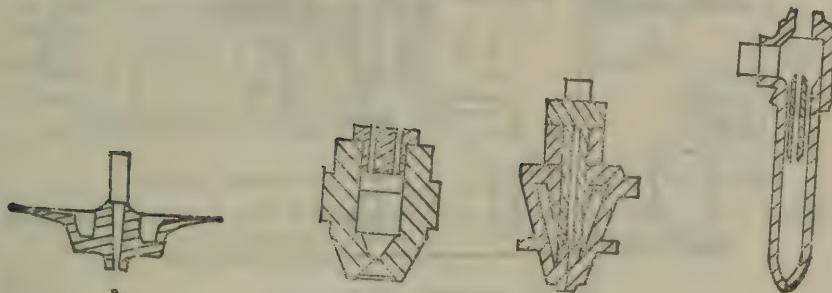


图 9-33 各种喷嘴及喷洒盘

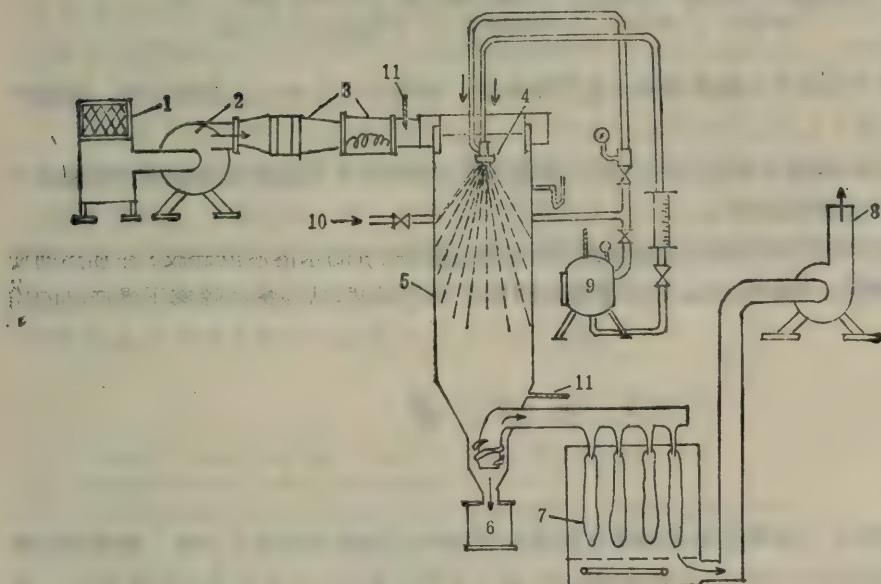


图 9-34 喷雾干燥装置

1. 空气过滤器；2. 鼓风机；3. 空气预热器；4. 喷头；5. 干燥室；6. 收集器；7. 袋滤器；8. 排风口；9. 贮料缸；10. 压缩空气；11. 风压表

入喷雾室的设备，(4)从湿热空气中分离细粉的装置。

使液体成雾的主要部件是喷嘴或喷洒盘。见图 9-33。其中 a 是喷洒盘，其余为喷嘴。喷雾干燥装置见图 9-34。

空气经滤框 1 过滤，由鼓风机 2 送入空气加热室 3。加热室内加热管的气压维持 8.5 公斤/厘米²，热空气温度 130℃。物料由空气压缩机或高压泵以 70 公斤/厘米² 的压力喷成细雾，在喷雾室内与热空气相遇立即蒸发干燥，得到极细的成品。干燥的细粉大部分落在喷雾室的底部，小部分被热空气带走的干燥细粉则被收集在袋滤器 7 中，废气经离心式排风鼓风机 8 排放到室外。

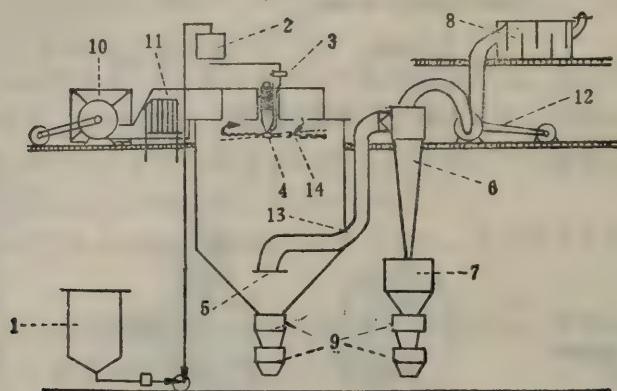


图 9-35 离心喷雾干燥设备流程图

1. 发酵液贮槽；2. 高位槽；3. 观察玻璃管；4. 离心喷雾盘；5. 出风管口；6. 旋风分离器；7. 受粉器；8. 沉降室；9. 双闸门卸料器；10. 进风鼓风机；11. 空气加热器；12. 排风机；13. 排风温度计；14. 百页窗式进风分配器

离心喷雾干燥装置包括干燥室、空气加热器、喷雾器、干燥成品收集器等，见图 9-35。

已除去水份、温度不高的热空气用于降温喷雾，可使喷雾干燥技术更适用于热敏物料（例如氨苄青霉素钠盐等）。

降温喷雾干燥的原理是利用吸湿剂（氯化钙、氯化锂等的水溶液或硅胶）在加热前使空气脱水。降低空气湿度，可以进一步降低喷雾干燥的温度，从而提高喷雾干燥产品的质量。

六、滚筒干燥

(一) 原理

滚筒干燥是将已经蒸发至相当稠度的液体在加热面展成薄层进行干燥，蒸发面与受热面显著增大有利于干燥，能大大缩短时间，减少受热的影响，也可以进行连续生产。滚筒干燥器能在常压或减压下工作。滚筒转速可根据物料干燥情况加以调节。如转速固定，则可控制浓度。滚筒干燥器分单滚筒及双滚筒两种。此法缺点是干燥温度较高，产品质量不及喷雾干燥，而且是片状，需粉碎，设备构造较复杂。

(二) 装置

- 1. 单滚筒干燥器** 用于浓缩抽提液或使稠厚物料干燥，兼有蒸发和干燥作用，装置

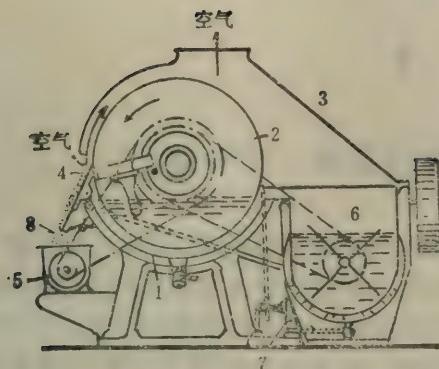


图 9-36 单滚筒干燥器

1. 槽；2. 转滚；3. 外壳；4. 刮刀；5. 螺旋运输机；
6. 贮料槽；7. 泵；8. 干燥产品

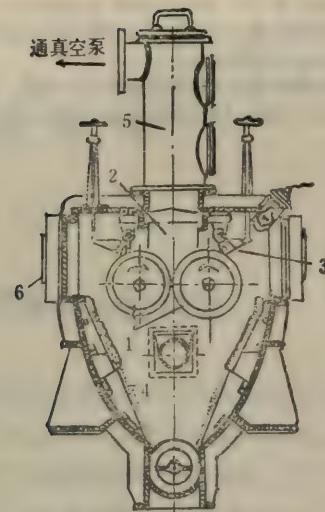


图 9-37 减压双滚筒式干燥器

1. 滚筒；2. 加料槽；3. 刮刀；4. 斜壁；5. 收集罩；
6. 观察孔

见图 9-36。

滚筒 2 中空，由铜或铝制成。液状易流动的物料呈均匀薄层沿凹槽 1 的全部宽度流下，涂布在滚筒 2 的表面。滚筒由齿轮传动，以 2—8 转/分的速度缓慢转动。随着滚筒的转动，从蒸气管进入筒内的蒸气供热使薄层物料中的水分迅速蒸发。转到刮刀 4 时，物料薄层已干燥，被刮刀 4 从滚筒表面刮下落到干燥产品接受器中。

如果将干燥装置放在密闭外壳中，吹入空气或抽真空都可以提高干燥能力。

2. 双滚筒减压干燥器 干燥能力成倍高于单滚筒式。流动的物料经加料室 2 呈薄层洒在滚筒上，滚筒每转一周，涂布于滚筒表面的料液立即干燥，被紧贴于筒上的刮刀 3 刮下，落于接受器中。干燥器中蒸发的溶剂蒸气通过捕尘器进入表面冷凝器冷凝。抽气泵接在冷凝器后面。从观察孔可以了解干燥及冷凝情况，见图 9-37。这种干燥器的蒸发效率很高，水分蒸发量可以达到 70 公斤/米²/小时。

参 考 文 献

- [1] 《有机化学实验技术》编写组：有机化学实验技术，科学出版社(1978)
- [2] 南京药学院主编：药剂学，人民卫生出版社(1978)
- [3] 中山大学生物系生化微生物学教研室编：生化技术导论，人民教育出版社(1978)。
- [4] 阿南功一等编：基础生化学实验法[2]，抽出·分离·精制，丸善株式会社(1974)
- [5] 王世中主编：免疫化学技术，科学出版社(1980)
- [6] 樊汝恭，刘尔翔：生物化学与生物物理进展，1, 71(1980)
- [7] 中国科学院北京植物研究所七室生化组修理组：生物化学与生物物理进展，2, 22(1975)
- [8] 中国科学院上海生物化学研究所三室：生物化学与生物物理学进展，36(1975)
- [9] Biomedical Products, Vol. 5, No. 2, p. 58(1980)
- [10] Freifelder, D. M., Physical Biochemistry Application to Biochemistry and Molecular Biology, W. H. Freeman and Company (1976)
- [11] 《微生物工程》编写组：微生物工程(下册)，上海科学技术出版社(1982)
- [12] 苏盛惠：医药工业，1, 44—45(1979)
- [13] 上海轻工业设计院、上海医药工业研究院编：干燥技术进展，第一分册，综述；第四分册，喷雾干燥(1977)。
- [14] Jakoby, W. B. (Ed.), Methods in Enzymology, Vol. XXII, Academic Press (1971)

- [15] Webb, F. C., Biochemical Engineering, D. Van Nostrand Company Ltd. London (1964)
- [16] 中国药学会生化药物学会、商业部生化药物情报中心站: 1981年全国生化药物学术会议专题报告集(一), 生化药物进展(1981)
- [17] 商业部脏器生化制药情报中心站编著: 动物生化制药学, 人民卫生出版社(1981)
- [18] Freeze Dry Apparatus, Labconco p. 24(1978)

第十章 样品的保存

方子谦

第一节 样品的保存与环境条件的关系

生化药物或生物制剂的正确保存，在生物化学以及医药科学领域中都有重要的意义，不适当的保存不仅造成经济上的损失，而且也给生化研究和应用带来很大影响。特别是一些用于大分子结构和功能研究的制剂或药品，以及分析用标准生化样品，要求更为严格的保存条件，防止失活、失效或变质。要保存好样品，首先就要对样品变质的一般规律以及样品的理化性质有足够的了解，才能确定某种样品的最适保存条件。

影响生化药物或制剂质量的因素很多，主要有空气、温度、水分、光线、酸碱度、样品的状态、微生物活动、保存时间和容器等。这些因素可单独起作用，但更多情况是协同作用，互相影响，从而加速样品的变质破坏。每种生化药物或制剂的理化性质和对上述因素的稳定性都不相同，必须结合具体情况，抓住主要矛盾，选择适当的贮存环境和条件。现将影响样品质量的几个主要因素分述如下：

1. 空气 空气的影响主要和潮解、微生物污染和自动氧化等有关。空气中的微生物污染可以使样品腐败变质，吸湿后的样品除引起潮解变性外也造成微生物活动的有利环境。某些具有较强还原性的样品，露置于空气中不久便氧化变质。如维生素C的失效、油脂的酸败、巯基酶的失活等。某些样品（特别是液体样品或半成品）在空气中的氧化是一种自动氧化过程，是由空气中的氧自发引起的游离基链式反应。自动氧化的机理很复杂，包括氧化、还原、聚合、水解等。氧浓度、水、pH、温度、紫外线等对自动氧化均有影响。

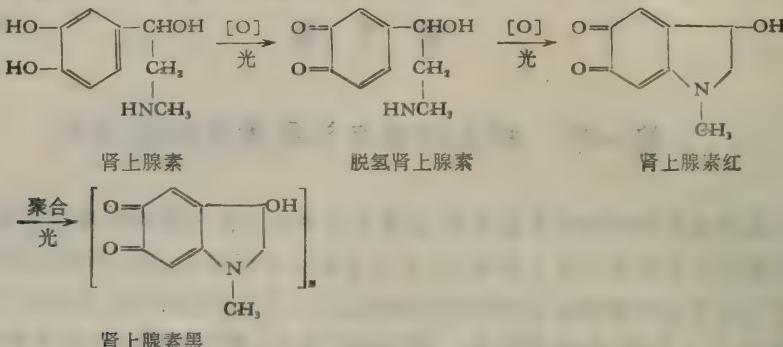
2. 温度 每种样品均有其稳定的温度范围，温度升高有利于许多物理和化学变化（如温度升高10℃，氧化反应约加快数倍，酶促反应约增加1—3倍。50℃以上蛋白质容易变性等等），不利于物质的稳定。同时，适宜的温度（如室温）又是微生物感染的重要条件。而低温却可以抑制氧化、水解等化学反应和微生物生长，使微生物处于生命迟缓和隐蔽状态。故大多数生化样品选择低温保存，稳定性可大大增加。

3. 水份 水份也是影响样品质量的主要因素之一。这里所指的水份，可能来自样品本身，也可能是样品吸湿的结果。水份除直接参与水解、酶解、水合和加合等反应外，还能加速氧化、聚合、离解和霉坏。蛋白质、核酸等大分子含水量太高时，会导致高级结构松散，稳定性下降而易于失活。因此，为避开或削弱水分子的影响，保存固态样品要密闭，液态样品须冻结或加稳定剂。

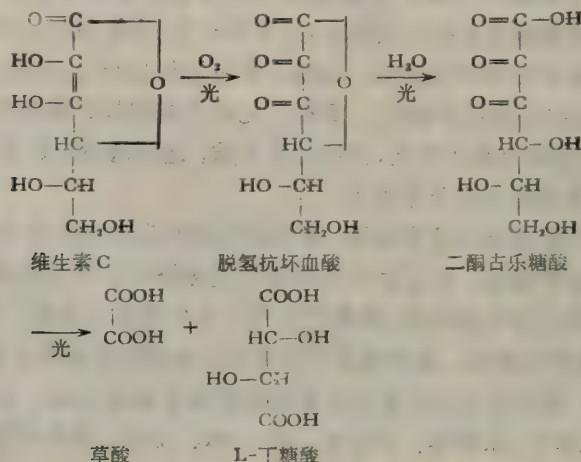
4. 光线 某些分子可吸收一定波长的光，反射或透过其它光波的光。样品吸收光后，使分子活化，内能增加，不利于样品保存。日光中的紫外线能量大，对生化药物或制剂的影响最大。在不同条件下，样品对光的敏感性各不相同，受光作用而发生变化的程度也

不同。

样品受光催化的反应有变色、氧化和分解等，通称光化作用，其中重要的是在有氧参与下的自动氧化作用。光化作用比较复杂，如肾上腺素在空气中受光催化进行自动氧化时，可能涉及复杂的氧化、聚合过程，颜色由淡黄→淡红→褐色→棕黑色。



维生素C的光化作用也涉及一系列的氧化、水解等反应。



因此，保存光敏感的样品时，必须注意避光。

5. 酸碱度 酸碱度对液态样品的保存影响较大。不同样品的稳定 pH 不同, 可由实验求得或从文献资料查得。液体样品保存时, 控制 pH 常用缓冲剂, 但选择缓冲剂不能只考虑缓冲容量的大小, 还要注意缓冲剂的种类和浓度对样品稳定性的影响。如一定浓度的氯霉素液用磷酸盐和醋酸盐缓冲剂调 pH5.95 时, 半衰期分别为 6.3 和 10.9 小时, 差别很大。青霉素用柠檬酸盐而不用磷酸盐和醋酸盐作缓冲剂, 因前者催化水解的速度小得多^[2]。某些以无机磷或有机磷作底物或反应产物的酶, 不宜用磷酸和焦磷酸缓冲液。

6. 时间 按照现代技术,生物或生化样品的永久存活仍无法办到,不同样品均有其不同的有效期。因此,保存的样品需要作定期检查、处理或更换。

第二节 样品保存的一般方法

1. 密闭保存

凡露置在空气中受水分、空气的影响易发生吸水水解(如含 $\text{RCO}-$)。

$\text{HN} \angle$ 、 RSO_2 —等基团的样品)或潮解(如含有 Br^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 SCN^- 、 NO_3^- 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 等基团的易溶于水的有机物)、氧化(如含 $-\text{SH}$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{NO}$ 、 S_2O_3 、 SO_3 基团的样品)或聚合(如含 $-\text{CHO}$ 、 $\text{C}=\text{C} \angle$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 基团的样品)、吸收 CO_2 而碳酸化(含 OH^- 、 $\text{R}_4\text{N}^+-\text{OH}$ 的样品)、易风化(含结晶水的样品)、挥发或霉坏的, 以至几乎所有的样品, 都可用密闭保存方法, 以防止空气及水份的侵入。玻璃瓶、安瓿是密闭保存最理想的容器, 固体、液体均可采用。有些极易氧化的样品, 瓶装时应尽量装满, 少留空隙, 以减少瓶内氧气的相对含量, 加塞(或盖)后蜡封保存。如果样品量少, 或为了取样方便及避免取样时样品吸水污染, 可用安瓿或小瓶分装。有时需充 N_2 或抽真空后再保存。易吸湿发霉(如胃蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶及一般含糖和蛋白质的不纯制剂)或吸湿后易分解失效(如青霉素、 NAD 等)的样品, 应放入内盛无水 CaCl_2 、硅胶、 P_2O_5 等干燥剂的干燥器中密闭保存。某些样品吸湿后, 经检查如不变质, 或未被其他杂质污染, 干燥后仍可再用(如糖类)。

2. 低温保存 生化药物或制剂一般对热敏感, 特别是生物大分子, 性质很不稳定, 容易受温度等环境因素的影响而变性失活。对热敏感的生物活性物质及易水解、氧化的物质的保存, 一般是温度愈低愈好。低温保存是多数样品保存的必要手段, 但由于不同样品具有不同理化性质, 耐热性不全相同, 必须根据样品的具体特性选择保存温度。例如木瓜蛋白酶粉能耐 100°C 干热 3 小时, 甚至在溶液中对热也极稳定。抗菌素、抗血清和胎盘球蛋白等血清类制剂, 在低温冰冻下保存最稳定。但一些对低温敏感的样品, 保存温度不能太低。此外还要注意, 用玻璃瓶或安瓿低温保存液体时, 不能装满容器, 以防液体冻结时膨胀, 使瓶子破裂。

3. 固态干燥保存 液体样品的保存虽然可省去较费时的干燥处理, 但由于水的存在, 使样品稳定性大大下降。加稳定剂可延长保存期, 又给使用带来许多的不便。因此, 样品通常都制成结晶, 或经干燥以至冰冻干燥成固体后再干燥保存。

固态干燥保存排除了水导致的不稳定, 创造了不利于微生物生存的条件。一些在水溶液中容易变性或水解、氧化的样品, 在干燥或低温干燥下都比较稳定。如干燥青霉素在完全无水条件下可以长期保持效价不变, 但吸湿或含水在 10% 以上时即分解失效^[1,2]。因此, 干燥后的固态样品须瓶装并放入干燥器内, 必要时置冰箱内保存。干燥保存是最古老, 最普遍采用的方法, 在生化药物和制剂的保存中占有重要的地位。

4. 避光保存 凡见光引起分解、氧化或变色的样品, 均应置棕色玻璃瓶或安瓿内避光保存。棕色玻璃能阻止某些波长的光线, 特别是紫外线的透过。如没有棕色瓶, 也可用黑色纸包裹或暗处避光保存, 以减弱光化作用。对光特别敏感者需用棕色瓶再外包一层黑纸保存。如上述肾上腺素、维生素 C 等都是对光极敏感的物质。维生素 B_2 干品较稳定, 但液态遇光也极易变质, 在碱性下生成光黄素, 中性或酸性下生成光色素。蛋白质(如葡萄糖氧化酶)在有氧存在下也受光的影响。这些物质需用棕色瓶密封后置冷处避光保存, 同时还要设法减少参与光化反应的其它因素(如 O_2 、 H_2O 、温度、 pH)的影响。

5. 添加稳定剂 液态保存常需根据不同样品的要求添加某些辅助成份, 如防腐剂、抗氧剂、酸碱调节剂等。这些物质对样品起一定稳定作用, 故通称为稳定剂。

(1) 防腐剂：用于抑制微生物生长、繁殖的防腐剂有：乙醇、酚类和氯酚类（如苯酚、氯甲酚）、有机汞化合物（如硫柳汞、硝酸苯汞、醋酸苯汞）、对羟基苯甲酸酯类（如对羟基苯甲酸的甲酯、乙酯、苄酯）等。选择防腐剂应以防腐能力和对样品有无影响为依据。例如酶的保存不能用汞和其它重金属化合物作防腐剂，因它们对酶有毒害作用。酶和一般蛋白质的防腐剂常用甲苯、 NaN_3 、氯仿、百里酚等。

(2) 抗氧剂：抗氧剂本身是较强的还原剂，容易氧化。有氧存在时，其自身首先被氧化，从而保护并延缓了样品的氧化。能强烈地与样品争夺 O_2 的物质，或能固定或鳌合金属离子的物质都可以作抗氧剂。抗氧剂选择的原则是：它不应与样品的主要成分作用，如本身是还原剂时，它的标准还原电位要比样品低，而且低浓度下也应有抗氧能力。常用的水溶性抗氧剂有： Na_2SO_3 、 NaHSO_3 、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、半胱氨酸、维生素 C、硫脲、甲硫氨酸等。常用的脂溶性抗氧剂有：没食子酸丙酯、对苯二酚、邻苯二酚、生育酚、二叔丁基对甲苯酚、焦性没食子酸、去甲二氢愈疮酸等。例如巯基酶用半胱氨酸作抗氧剂，维生素 A、D、油脂等可用没食子酸丙酯或对羟叔丁茴香醚等作抗氧剂。

样品中微量金属杂质（如 Cu^{++} 、 Fe^{+++} ）是自动氧化或水解作用的催化剂，起促进分解的作用，通常可加入某些金属螯合剂或沉淀剂来防止。例如维生素 C 在极微量的 Cu^{++} 、 Fe^{+++} 、 Mn^{++} 存在下便能被氧化和水解，但如加入磷酸三钠与金属离子作用即能抑制分解。最常用于结合金属的抗氧剂是 EDTA 钠盐（ $1-3 \times 10^{-4} M$ ），在广泛的 pH 范围内它都能与样品液中许多金属离子螯合，生成稳定的水溶性螯合物。EDTA 已广泛用作酶、抗坏血酸、肾上腺素、青霉素等的抗氧剂，有效地防止或延缓了氧化分解作用。

(3) 惰气填充剂：充填惰气是稳定样品，防止氧化的有效方法之一。少量易氧化固体样品可用安瓿充填惰气保存。如果是液体样品，也可用惰气驱除液中残存的氧，然后再充气保存，此时不加任何抗氧剂，效果也很理想。样品充气保存的例子很多，如细胞色素 c 的充 N_2 保存，维生素 C 的充 CO_2 保存等。但不是所有样品都能充惰气保存，如维生素 K 充惰气后反使分解速度加快，使用时必须加以注意。

6. 制成高稳定性的盐类或衍生物 许多样品由于水解或氧化会使稳定性下降，但制成盐类或对其结构进行化学修饰改造后，效力不降，稳定性却得到了很大的改善。如青霉素 G 经制成钾、钠盐，维生素 C 经修饰为维生素 C 苯甲酸酯后，效价不变，但稳定性大大提高了。

样品的保存除了正确选择上述方法外，常须注意以下事项：

(1) 保存的样品一律要贴标签，标明样品的名称、制造单位、含量（浓度、效价或活性）、添加成份、日期、有效期或使用期，以及必要的附加说明。

(2) 定期检查，如有变质者，应立即查找原因，并作及时处理。凡保存期过长的样品，均应慎用或经检验、处理后再用。变质样品一般可用眼、口、鼻从外观上（如发霉、变色、沉淀、挥发、酸败、气味、潮解、粘结等）判断，但也有的外观不变而已失效者，切勿大意。

(3) 不同样品应按性质分类保存。如干燥样品和液态样品不宜一起存放，易挥发样品应与其它样品分开保存等。

第三节 各类生化物质的保存

一、蛋白质的保存

蛋白质失活受多种理化因素的影响，保存时必须根据其不同特性，采用不同措施，以防止变性或降解。蛋白质的保存方法如下：

(一) 液态保存

1. 在低温下保存 蛋白质对热敏感，温度越高，稳定性越差。因此，低温保存蛋白质溶液在绝大多数情况下是有利的。一般蛋白质越纯，其稳定性越差。特别是纯酶溶液，对热甚不稳定（少数酶例外，如核糖核酸酶能短期煮沸，胰蛋白酶能在稀 HCl 中耐 90℃，及某些高温细菌产生的耐热性酶等），多数在 35—40℃ 以上就会失活，难以长期保存，在普通冰箱中通常也只能保存一周左右。因此，液态蛋白质样品常常在一5——10℃ 以至 -20℃ 以下冰冻保存比较理想，有时经数月或数年仍保留大部份活性^[4]。

但是，各种蛋白质的耐热性不同，并非温度越低，保存越稳定。例如鸟肝丙酮酸羧化酶对冷敏感，25℃ 左右稳定，低温反而容易失活。而南北极中某些鱼类的抗冻蛋白，在极低温度下仍保留其活性。羧肽酶、脂蛋白和某些抗体经冰冻再融解后，即完全变性破坏。但某些酶如酸酶液经冻融后，活性反而增加，这可能是由于酶颗粒发生了散解，表面积增大，暴露出更多活性基团的缘故。反复冰冻和融化一般会导致蛋白质变性，必须尽量避免^[4,5]。为了防止冻融损伤，冰冻保存要求样品浓度大、体积小、表面积大、含盐低、冻结迅速、-70℃ 以下保存、用时迅速融化等。

2. 在稳定 pH 下保存 多数蛋白质只有在很狭窄的 pH 范围内才稳定，超出此范围即迅速变性。如鲸肌红蛋白在等电点 pH6.8 附近时稳定，卵类粘蛋白在中、酸性条件下对热稳定^[6]。蛋白质较稳定的 pH 一般在等电点。因此，酸性、中性和碱性蛋白酶的稳定 pH 分别为 pH2—6、pH6—9 和 pH5—10.5^[7]。但也有例外，如血浆蛋白质的等电点 pH4.6，而其稳定 pH 为 6.8，稳定 pH 与其等电点并不相同。酶的最稳定 pH 也并非是酶反应的最适 pH，二者有时可相差 1 至数个 pH 单位。所以保存液态蛋白质样品时，应小心调到其稳定 pH 范围内。

3. 在高浓度下保存 液态蛋白质易受水化作用影响，保存时浓度不能太稀（如 1 毫克/毫升以下），否则将可能引起亚基解离、表面变性或器壁吸附。一般蛋白质在浓溶液中比较稳定，中间样品的保存可采用湿的沉淀。需要保存酶溶液时，其蛋白质浓度也应大于 1%。保存较长时，还需加入防腐剂、蛋白酶抑制剂或其它稳定剂。如免疫球蛋白可加 NaN₃ 至 0.04%，-20℃ 下进行冰冻^[8]。蛋白酶抑制剂的选择：中性蛋白酶常用 EDTA；碱性蛋白酶用二异丙基氟磷酸 (DFP)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)；酸性蛋白酶用十二烷基磺酸钠、N-溴琥珀酰亚胺。活性中心为丝氨酸的蛋白酶加二异丙基氟磷酸；活性中心为巯基的蛋白酶加对氯汞苯甲酸等^[7,9]。但某些抑制剂（如 DFP、PMSF）不仅抑制蛋白酶，对其它酶可能也有抑制作用，使用时应慎重。

4. 在保护剂存在下保存 很早就有人观察到，在无菌条件下，室温保存了四十五年

的血液，血红蛋白仅有少量改变，许多酶仍保留部分活性^[10]。另一方面又观察到，有些纯酶液即使在冷却下也甚不稳定，保存期仅为几小时至几天。这是由于血液中含有某些蛋白质稳定因素，而纯酶则恰好相反，缺乏这些稳定因素。为了较长期保存蛋白质溶液（特别是敏感的纯酶或稀蛋白溶液），常常加入某些稳定剂进行保护。现将几类蛋白质的稳定剂介绍如下：

（1）惰性生化或有机物质：多数蛋白质要求较为疏水的环境才能长期保存。加入某些物质降低溶液的极性，可保护蛋白质以免变性失活。这类蛋白质的稳定剂有糖类（单、双糖、或多糖）、脂肪类（包括脂肪酸）、蛋白质类（如牛血清白蛋白、明胶）、氨基酸（如谷氨酸钠、甘氨酸、半胱氨酸）等生化物质，以及多元醇（如甘油、丙二醇）、二甲亚砜、有机溶剂、羟羧酸（如柠檬酸钠）、多聚阴离子（如多磷酸盐）、表面活性剂等普通有机化合物，可根据需要而加以选择。

如消化性蛋白酶在甘油液中十分稳定，浓酶液加等体积甘油于-20℃下可较长期地保存，但稀释时活性会下降^[10,11]。二甲基亚砜也是蛋白类物质低温保存的常用保护剂。在某些情况下，加入有机溶剂使酶处于稳定的非极性环境，对酶也呈现稳定作用。如小田假单孢菌的间苯二酚酶在含10%丙酮的50mM磷酸缓冲液（pH7.5）中稳定，假单孢菌属的苯甲醇脱氢酶用20%丙酮或乙醇几乎能保存全部活性^[12]。

许多蛋白质可用糖类来保存。如酵母转化酶的活性与糖类有关，用皂土除去多糖后稳定性即下降。血浆r-球蛋白也可用糖类（甘油也可以）来稳定，但不为脂肪酸稳定^[10]。用蛋白质保存蛋白质也是一种常见保存方法，如溶菌酶用白蛋白、鱼精蛋白、聚赖氨酸，木瓜蛋白酶用骨胶元的部分水解产物来保护^[10,13]。一些蛋白质也用脂肪酸保存，如结晶的人或牛血清白蛋白需少量脂肪酸保护，除去后变得不稳定。

（2）中性盐：相当部份的蛋白质要求高离子强度（1-4M或饱和盐液）的极性环境才能保持其活性，加入中性盐可稳定这类蛋白质。例如胰蛋白酶在饱和MgSO₄中冰箱放置可较长期保存。木瓜蛋白酶悬浮在浓NaCl中，4℃下可保持许多个月不失活。蛋白质用硫酸铵沉淀或用硫酸铵反透析浓缩成糊状（硫酸铵糊）是一种很好的保存方法，用前再透析或用分子筛脱盐^[3,4,14]。

（3）巯基试剂：一些蛋白质表面或内部含有半胱氨酸巯基，易被空气中的氧缓慢氧化为次磺酸或二硫化物，使蛋白质的电荷或（和）形状发生改变而失活。保存时可加入巯基试剂半胱氨酸、2-巯基乙醇、二巯基苏糖醇、二巯基赤藓糖醇等（浓度 10^{-4} - $5\times 10^{-3} M$ ），保护蛋白质处于还原状态，然后在隔绝空气中（甚至真空或惰气中）密闭保存。

巯基酶除氧化外还常与重金属（如Fe、Mn、Cu等）结合而失活，这时加入微量EDTA、Na₂S等可以解除。在保存中应注意容器、试剂和水的质量，尽可能避免重金属污染。

（4）酶反应因子：某些酶可为底物、辅酶、竞争性抑制剂、活化离子、反应产物等所稳定。例如酵母己糖激酶、顺乌头酸酶、N-甲基谷氨酸合成酶等只有分别与底物葡萄糖、柠檬酸、L-谷氨酸共存；D-磷酸甘油醛脱氢酶（兔肌）只有与其辅酶NAD共存才能稳定。一旦这些底物或辅酶被除去或不存在，酶的稳定性大大下降。又如淀粉对淀粉酶有稳定作用，故往往将酶吸附在淀粉上保存。D-氨基酸氧化酶与其底物D-氨基酸的竞争性抑制剂安息香酸钠或其辅酶FAD结合时，抗热变性的能力大增^[12]。有人认为，底物、辅酶、抑

制剂使酶稳定的可能原因是降低了活性中心的能量水平，使酶趋于稳定。

添加活化无机离子也能增加某些酶的稳定性。例如当动物和微生物淀粉酶存在 Ca^{++} ，溶菌酶和精氨酸酶存在 Mn^{++} 及透明质酸酶存在 Cl^- 或 Br^- 时，稳定性可大大增强^[12,15]。青霉属的核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶当存在 1×10^{-5} — 1×10^{-4} M 的 Zn^{++} 时，耐热性则大大提高^[16]。因此，某些含金属离子的纯酶（如淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶）变成另一特定活化金属离子的结晶时，即能大大提高酶活，并增加酶稳定性。如结晶 Ca 式淀粉酶和胃蛋白酶的酶活力甚至比一般结晶酶活力高 2.8—3.6 倍^[17]。

但是，同一类保护剂对一种蛋白质或一种保护剂对同一类蛋白质的保护作用往往相差很大。例如 5'-AMP 能激活磷酸化酶 a 并对热失活有保护作用，而 3'-AMP 则对酶无激活作用且能加速酶失活^[18]。0.2MKCl 可使 KB 细胞 DNA 聚合酶 N₁ 稳定并使活性增加 13%，而对 KB 细胞的 DNA 聚合酶 C 却有抑制作用，使酶活下降到 11%^[19]，使用时不能大意。

（二）固态保存

1. 制成干粉或结晶 固态蛋白质比液态稳定。一般蛋白质含水量超过 10% 时，无论在室温或低温均容易失活；含水量若降低至 5% 时，在室温或冰箱中均比较稳定，但在 37°C 活性则明显下降。低含水量对微生物和化学活性不利，一般认为，微生物活性在含水量 10% 以下、化学活性在 3% 以下即被抑制^[20]。

长期保存蛋白质的最好办法是把它们制成立晶或干粉。干粉的制备有很多方法，冰冻干燥是酶保存普遍采用的方法之一。由于冰冻干燥蛋白质分子内脱水比冻融更完全，为了防止冻干过程中蛋白质的部分变性，除干燥时间须迅速外，有时可选择加入某些稳定剂或缓冲剂（如挥发性的碳酸盐和醋酸盐缓冲液）。所用稳定剂与前述冻结保存相同，最低有效浓度为 0.03M 即可达保存大部分活性的目的。冻干失活也与温度和离子强度有关。如谷氨酸脱氢酶对冻融稳定，但冻干也引起失活。离子强度为 0.1 时，-30°C、-80°C、-196°C 冻干使此酶活性由 100% 下降为 51%、42% 和 38%；离子强度为 0.01 时，活性又分别降为 45%、42% 和 30%^[21]。

结晶和冻干品均具有增强抗热性、稳定蛋白质的良好效果，而且易于保存，便于运输。多数固态蛋白质和酶在盛有干燥剂的干燥器中，低温下（0—4°C 或更低）可相当长期地保存。如干态葡萄糖氧化酶在 0°C 下可保存二年，-15°C 下可保存八年。有些甚至在室温下也能保存数月或经年之久^[11]。

2. 制成水不溶酶 除物理吸附法制成的不溶酶热稳定性下降外，在多数情况下，酶经固定化后，其对酸碱、蛋白酶、温度等稳定性普遍提高，并更易于保存。如氨基酸酰化酶用离子结合法与 DEAE-Sephadex 制成不溶酶后，经在 70°C 加热 15 分钟进行比较，天然酶与 DEAE-Sephadex 酶的残留酶活分别为 10% 和 80%。上述酶在一定条件下用胰蛋白酶处理后，残留酶活分别为 23% 和 87%^[22]。不溶酶的耐热性及抗蛋白酶能力均比天然酶大大提高了。因此，酶和载体结合普遍增加酶的保存期。如脲酶 4°C 保存 15 天失活 60%，二个月失活 80%，而固定化脲酶 4°C 保存 50—80 天不失活^[23]。乳酸脱氢酶 25°C 30 天全失活，而用载体交联法（多孔玻璃加戊二醛）固定的不溶酶则仍保留 100% 活性^[22]。固定的 3-核糖核酸酶低温冰箱保存一年活性仍无明显变化^[24]。

3. 制成酶衍生物 这也能提高某些酶的稳定性。如淀粉酶可制成氯化烷二甲基苯

胺或聚碳酸卤化物的衍生物，细菌蛋白酶、核糖核酸酶、葡萄糖氧化酶和酰化酶等都可用某种高分子化合物作成衍生物。天然酶经上述处理后，耐热性均得到提高。如木瓜蛋白酶经制成熟晶汞衍生物后，稳定性增加，可数月保持不失活^[11]。

总的来说，蛋白质的保存主要还是从稳定构型、保护活性中心、避免辅助因子丧失等方面考虑，以防止变性、解聚或降解。由于温度和水份对蛋白质结构的稳定性影响最大，故蛋白质最好是低温、冰冻或冰冻干燥后低温干燥保存。一些酶的保存方法和稳定性见表 10-1。

二、核酸的保存

核酸保存的条件与蛋白质和酶大致相同，凡影响核酸变性和降解的因素在样品保存中均应避免。一般保存方法如下：

1. 浓盐液 由于水、稀电解质都可以断裂核酸的氢键，破坏其双螺旋结构，使核酸变性。因此，保存核酸时，必须注意水的影响，防止稀释变性。一般保存可用浓盐液、NaCl-柠檬酸缓冲液(pH7)或0.1M醋酸缓冲液。DNA的液态保存，所用盐浓度常为1M或0.01—1MN_aCl，浓度不应低于 10^{-3} — 10^{-4} M。用盐溶液保存核酸时，须配合低温(0℃以上)及加防腐剂(氯仿或1mMN_aN₃)、核酸酶抑制剂等措施^[25]。如DNA可在0.15MN_aCl和0.015M柠檬酸钠溶液中(1毫克/毫升)，加几滴氯仿后于4℃保存，几个月仍稳定不变^[26]。低分子量RNA(如tRNA)可干态保存，但高分子量RNA应在含2%NaAc的75%乙醇中4℃下以浆状保存^[25]。液态质粒可加甘油后贮存在-10℃，也可在10mM Tris-HCl(pH7.8)、10mMN_aCl、1mM EDTA-Na₂溶液中于4℃下保存^[27]。

2. 稳定 pH 核酸溶液的保存也受pH的影响，过酸过碱均会导致碱基上形成氢键基团的解离，使氢键稳定性下降以至断裂。对DNA来说，分子上的碱基在pH4—11范围较稳定，超出此范围DNA易变性或降解。低温、酸性或稀碱下保存DNA及低温酸性下保存RNA均较稳定。

3. 低温 核酸变性温度一般为70—85℃，DNA的变性温度还与GC含量有关，GC含量愈大，变性温度愈高。通常固态核酸在0℃以上低温下干燥保存即可。小分子核酸保存温度还可更低些，如固态tRNA可在-10℃下保存^[28]。液态核酸室温下容易变性，短期最好低温(4℃)保存，但不宜冻结，否则将破坏大分子结构^[25]。也有报道牛肝RNA溶于50mM NaCl后-35℃低温冰冻保存，二个月内不变性或降解，但应避免重复冻融^[29]。电解质的存在对核酸冰冻有一定保护作用。如将含0.15MN_aCl和0.015M柠檬酸钠的DNA在-70℃快速冷冻，后于-20℃保存，可长达一年之久不变^[26]。

核酸的保存也与使用目的有关，用于制备单核苷酸和用于结构、功能研究的样品，所要求的保存条件各不相同。

三、油脂的保存

脂肪和油保存不当会发生酸败，酸败是由水解和氧化作用所引起。酸败的油脂比重减小、碘值降低、酸值增高，可作为油脂保存中质量检查的指标。根据油脂酸败时化学变

化的特点，可把酸败分为两大类，其特点及保存方法如下^[30,31]：

1. 水解酸败 水解酸败是由于油脂杂有脂肪酶，在水及其它适宜条件下（如25—35℃、pH4.5—5），催化油脂的不饱和双键水解，产生游离脂肪酸。含水油脂容易长霉菌和酵母菌，产生脂肪酶和脂肪氧化酶，因此即使在0℃以下保存，也会发生酶水解。所以，长期保存油脂的关键是除去水分，在无水状态下保存。通常把油脂加热灭菌处理，即可达破坏脂肪酶和除去水分的目的。

2. 氧化酸败 氧化酸败比水解酸败更常见，在油脂保存上也更重要。油脂一般都含有不饱和脂肪酸，不饱和程度愈高，也即含双键愈多，愈易发生氧化酸败（如亚油酸）。某些金属（如Co、Mn、Cu、Fe等）、光、水和热等都能加速油脂的氧化变质，使不饱和双键加氧生成过氧化物，后者进一步聚合或分解为具有特殊臭味和味道的低分子游离酸、醛、酮等，可借感官来判断。

由于油脂氧化酸败是由多因素引起，长期保存必须消除不利因素的影响。因此，油脂一般都应避光、低温、密闭保存，尽量充满容器，除尽水分和灭菌。必要时也可加入抗氧剂，阻止或延缓氧化进行。粗制油脂一般含有天然抗氧剂（如维生素E、棉酚、芝麻酚或麦胚酚等）但精制后含量降低，故精制油脂（尤其是油）较不稳定，容易氧化酸败。因此，精制油必须加入抗氧剂（如邻苯二酚），而非天然抗氧剂多为侵蚀性物质（酚、胺等），较理想的抗氧剂目前还很难找到。常用的抗氧剂有五倍子酸的酯类、二丁基甲酚、维生素E等，也可加增效剂（如脑磷脂、维生素C及其酯类）增强抗氧效果。抗氧剂、增效剂的选择标准是：（1）能较长期抗酸败；（2）能溶解油脂；（3）无不良气味和味道；（4）无毒性。

此外，某些含不饱和双键的固醇类（如麦角固醇）、磷脂类（如卵磷脂）也容易氧化变质。如麦角固醇经一系列光化反应可变为维生素D₂，后者继续氧化为无活性或有毒的化合物。所以这类物质也要避光低温下密闭保存。

高级不饱和脂肪酸、油脂或磷脂类也可根据需要固化后在P₂O₅中保存，或用低极性溶剂溶解为高浓溶液，后者在避光低温（-20℃）下，密闭保存1—2年不分解^[32]。

四、细胞及生物制剂的保存

动植物培养（或分离）细胞、以至器官和组织都可加入低温保护剂（常用5—10%甘油和二甲基亚砜）后，于低温冰冻下保存。保存细胞的存活率与冰冻方法、保存温度和时间、融化温度、保护剂、细胞的种属和性状等有关。不同细胞对保存条件的要求往往相差很大。植物培养细胞保存的主要环节如下：预培养→加等体积低温保护剂混匀→冰冻（慢冻，1—5℃/分；预冻，-20—-70℃；快冻，直接浸入液氮）→-40—-100℃→在营养条件下低温保存（-100—-196℃）→迅速解冻（34—40℃）→再培养。动物细胞的冰冻保存大致相同，但动物细胞与植物细胞的保存期和存活率各有差别^[33—37]。

病毒和噬菌体常在10mM Tris-HCl(pH7.6)、10mM NaCl、1mM EDTA-Na₂溶液中4℃下保存^[27]。纯化病毒悬浮液也可加少量防腐剂（NaN₃、甲苯、氯仿等）或等体积甘油保存于0—4℃低温中。冻干保存时，一般加入5—10%蛋白胨和葡萄糖作稳定剂，以防冰冻时丧失感染活性^[38]。

生物制剂（如菌苗、疫苗、类毒素、抗毒素等）的稳定性差别较大，需根据不同情况选择

表 10-1 一些酶保存的条件和稳定性^[6,27,39-41]

名称	保存条件	稳定性
胰蛋白酶	(1) 液态 pH3 冰箱保存(加 Ca^{++} 保护更好);(2)固态 5℃ 保存	(1)数周内不失活。如 pH2.3—3 室温下可稳定几天,低于 pH3 易变性,高于 pH5 易自溶;(2)可稳定几个月不变
胃蛋白酶	冻干品 4℃ 干燥下保存	可稳定很多个月至一年。酶液 pH>6 易失活
淀粉酶	(1) 干粉 -20℃ 保存;(2) α -淀粉酶结晶在 $\text{NaCl}-\text{CaCl}_2$ 或 2—3M 硫酸铵中 4℃ 冰箱保存	(1) 可保存一年;(2)可保存很多个月。酶活加 Ca^{++} 和调 pH4.8—10.6,可增加稳定性、冻干易失活。
糜蛋白酶	(1) 干粉 4℃ 保存;(2)酶液 pH2—6,37℃ 保存;(3)酶液 pH3 冰箱保存	(1)一至几年内稳定;(2)4 小时失活 20%;(3)几天内稳定
脱氧核糖核酸酶 I	冻干品 5℃ 下保存	2—5 年内稳定
RNA 酶 A	干粉 4℃ 下干燥保存	半年内稳定。酶液酸性范围 (pH2—2.5) 最稳定
脲酶	(1) 在 50% 甘油中 2℃ 下保存;(2)干粉 4℃ 保存	(1) 可稳定几个月;(2)可稳定一年
羧肽酶 Y	(1) 在饱和硫酸铵中 -20℃ 下保存;(2)酶液 (1%, pH7) 在 -20℃ 冰冻保存	(1) 可长期保存;(2)二年内不失活,但稀释至 0.1 mg/ml 则迅速失活,反复冻融引起失活。其水液 25℃ pH5.5—8.0 下 8 小时内稳定
羧肽酶 A	酶结晶水溶液 4℃ 保存	较稳定
羧肽酶 B	浓酶液(在水或 pH7.5 的稀 Tris 缓冲液中) -10℃ 冰冻保存	一年内稳定
氨肽酶(胞浆)	(1) 干态 0—4℃ 保存;(2)悬浮于 3M 硫酸铵中(含 0.1 M pH8 Tris-HCl 和 5 mM MgCl_2) 4℃ 保存	(1) 可稳定几个月;(2)可保存 4 个月。其水液 pH7—9 最稳定,可保存 2 天
脂肪酶	(1) 酶液在巴比妥缓冲液和牛胆酸钠液中 (pH3—7) 4℃ 保存;(2)干粉 -20℃ 保存	(1) 可保存一个月;(2)可保存二年
弹性蛋白酶	干品 5℃ 下保存 (-10℃ 更好)	可保存 6—12 个月。液态 pH4—10.5 于 2℃ 下较稳定, pH<6 稳定性有所增加
果胶酶	干粉 4℃ 保存	可保存半年。其溶液 50℃ 稳定, 62℃ 30' 全失活
木瓜蛋白酶	(1) 干粉 4℃ 保存;(2)悬浮于浓 NaCl 中 4℃ 保存	(1) 可稳定 6 个月;(2)可保存许多个月。
β -葡萄糖苷酶	(1) 冻干品 5℃ 保存;(2)悬浮于硫酸铵中 5℃ 保存	(1) 1—2 年内稳定;(2)6 个月失活约 10%
β -葡萄糖苷酸酶	(1) 冻干品 4℃ 保存;(2)冻干品 -20℃ 保存	(1) 可保存半年;(2)可保存 2 年以上
透明质酸酶	(1) 冻干品 4℃ 保存;(2)酶液 4℃ 保存	(1) 可稳定一年以上;(2)可稳定 2 周。稀酶液可加 0.2% 或 0.5% 阿拉伯胶或 0.2% 明胶保护。用 pH6 的缓冲液可增加稳定性。
溶菌酶	(1) 干粉 4℃ 保存	一年以上不失活。酶液酸性条件下 (pH4—5) 最稳定
氨基酰化酶	干粉 -20℃ 保存	可保存二年。酶液中性 pH、70℃ 可放 1 小时, pH<5 立即失活
β -半乳糖苷酶	4℃ 保存	4—6 个月内稳定

续 表

名 称	保 存 条 件	稳 定 性
水 解 酶	(1) 干粉 4℃ 保存; (2) 酶液于中性 pH、-4℃ 下保存	(1) 可稳定半年; (2) 很稳定
	干粉 4℃ 保存	可保存一年。酶液 pH4—6 最稳定
	(1) 粗酶冻干品 -20℃ 保存; (2) 纯酶干粉 -20℃ 保存	(1) 能保存二年; (2) 可保存半年。最适稳定 pH9—10 (肠), 血中碱性磷酸酯酶 25℃ 较稳定
	冻干品 -20℃ 保存	可保存二年。酶液在 pH<6.5 或酶液加入柠檬酸和醋酸, 降低 pH 可增加稳定性
	干粉 4℃ 保存	6 个月失活 15%。酶液 pH<5, pH>10 不稳定, 冻干会失活
	在 1M KCl—1mM2 巯基乙醇中冰箱保存	20—25 天内稳定
	(1) 干粉 -20℃ 或 -50℃ 保存; (2) 纯酶在 pH8 缓冲液中冰冻保存	(1) 几个月内不失活; (2) 相当长时间不失活
	(1) 干粉 4℃ 保存; (2) 酶液在 50mM, pH7.2 磷酸缓冲液中 4℃ 保存	(1) 半年不失活, (2) 可稳定数天
	干粉 4℃ 保存	一年内不失活。酶液 pH6—10 最稳定
	(1) 浓酶液 3—15℃ 下保存; (2) 结晶酶于 0.5 饱和度硫酸铵中低温保存; (3) 对 0.1M pH7 磷酸缓冲液透析后冰冻保存; (4) 酶结晶在 3.2M, pH7 硫酸铵中 4℃ 保存	(1) 可稳定几个月。高度稀释极不稳定; (3) 二个月左右活力不变; (4) 可稳定 1—几年。纯酶水液不稳定
氧 化 还 原 酶	(1) 干粉 4℃ 保存; (2) 结晶酶悬浮于 3.2M pH6 硫酸铵中 4℃ 保存	(1) 几个月内活力不变; (2) 可保存一年
	(1) 固态 4℃ 保存; (2) 在 1.8M 硫酸铵中 pH6.25 下 4℃ 保存	(1) 12 个月内稳定; (2) 几个月内稳定, 但稀释后易失活, 如含 1×10^{-5} M FAD 可排除
	(1) 5℃ 保存; (2) 干粉 4℃ 避光干燥保存	(1) 所有制剂 6—12 个月均稳定, 但冰冻或冻干会失活; (2) 一年内稳定。液态 pH7 较稳定
	干粉 4℃ 避光干燥保存	一年内稳定。液态 pH<3.5, pH>12 不稳定
	冻干品 -20℃ 保存	可稳定一年。干品加蔗糖, 液态酶加 0.1% 牛血清白蛋白可增加稳定性
	在 50% 甘油中 4℃ 下保存	可稳定几个月
	(1) 冻干品 4℃ 保存; (2) 酶结晶悬浮于 3.2M 硫酸铵 (pH6) 中 4℃ 保存	(1) 3—6 个月内稳定; (2) 几个月内稳定
	(1) 冻干品 4℃ 保存; (2) 酶结晶悬浮于 70% 饱和硫酸铵中 5℃ 保存	(1) 一年内不失活; (2) 二年不失活。稀溶液加白蛋白可增加稳定性
	(1) 纯酶液 4℃ 保存; (2) 酶液冰冻保存	(1) 保存过夜失活 10% 左右; (2) 6 个月活力不变
	(1) 冻干品 4℃ 保存; (2) 酶液调 pH4—6.5 并加葡萄糖后 4℃ 保存	(1) 半年至一年内稳定; (2) 酶液 pH>8 温度大于 50℃ 不稳定。加葡萄糖有保护作用
尿酸酶	干品 -20℃ 干燥保存	可至少稳定二年。液态 pH6.5—10.5 较稳定

续 表

	名 称	保 存 条 件	稳 定 性
氧化还原酶	胺氧化酶	冻干品 -20℃ 保存	较稳定。液态 pH7.2-7.6 最稳定
	黄嘌呤氧化酶	冻干品 4℃ 保存	6 个月基本稳定
	单胺氧化酶(牛肝)	在 0.5-1.0% Triton X-100 中 4℃ 保存	3-4 天内稳定
	山梨糖脱氢酶	冻干品 4℃ 保存	相当稳定
	3-磷酸甘油醛脱氢酶	悬浮在 2.5M 硫酸铵中 0-4℃ 保存	可稳定半年。酶液在 pH<6 不稳定
转换酶	酰化酶 I	干品 5℃ 密闭保存	一个月活力不变。冻干品 37℃ 加热 2 天或液态 pH7 在磷酸缓冲液中 60℃ 加热 1 小时活力不变, 但 pH5 以下易失活
	肌酸激酶	冻干品 4℃ 或 -20℃ 保存。	4℃ 下 6-12 个月活力不变。-20℃ 可保存一年。其液 pH7-9 最稳定
	丙酮酸激酶	冻干品 4℃ 保存; 悬浮于 3M 硫酸铵中 4℃ 保存	至少可保存一年
	谷丙转氨酶	(1) 干粉 -20℃ 保存, (2) 结晶酶在 3.2M 硫酸铵中 (pH6)4℃ 保存	(1) 可稳定 2 年, (2) 可稳定 3-6 个月
	谷草转氨酶	(1) 冻干品 4℃ 保存, (2) 在 3.2M 硫酸铵中 (pH6)4℃ 保存	(1) 6-12 个月内稳定 (2) 可稳定几个月
解酶或合酶	己糖激酶	(1) 冻干品 4℃ 保存; (2) 悬浮于 3.0M 硫酸铵液中或 50% 甘油中 0-4℃ 保存	(1) 可保存一年, (2) 可保存一年
	醛缩酶	悬浮在 3.2M 硫酸铵中 (pH7.6)4℃ 保存	6 个月内稳定。pH<4.5 酶不可逆变性
	碳酸酐酶	(1) 干粉 -20℃ 保存; (2) 浓酶液 (pH5-10)5℃ 保存	(1) 至少可稳定二年; (2) 可保存一年
RNA 或 DNA 聚合酶	柠檬酸合成酶	干粉 4℃ 保存	酶液 pH5.5-10.0 较稳定, 离子强度为 0.2 时很稳定
	T4 DNA 聚合酶	纯酶液中 (0.86mg/ml) 含有 200mM 磷酸钾缓冲液 (pH6.5)、10mM 2-巯基乙醇, 50% 甘油, 保存在 -20℃	10 个月内活力不变
	小牛胸腺 DNA 聚合酶 a	纯酶在 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH7.0)、1mM 2-巯基乙醇、50% 甘油中, 保存在 -20℃	
	大肠杆菌 DNA 聚合酶 I	同 上	
	RNA 聚合酶	在 10mM β-巯基乙醇、10 mM MgCl ₂ 、100 mM KCl、0.1mM EDTA、50% 甘油、10mM Tris-HCl (pH7.9) 中安瓿充 N ₂ , 后于 -20℃ 保存	2-3 个月活力不变
RNA 或 DNA 修饰酶	哺乳动物细胞低分子量 DNA 聚合酶	在 20 mM Tris-HCl (pH8)、200 mM NaCl、1 mM 巯基乙醇、0.1 mM EDTA、50% 甘油中 -20℃ 保存	6 个月内维持稳定
	ECoRI 限制性内切酶	酶液分装于安瓿 4℃ 或 -20℃ 保存	-20℃ 可保存一年以上
	限制性内切酶	50% 甘油中 -20℃ 保存	长期保存不失活
	T ₄ RNA 连接酶	纯酶在液氮或 -20℃ 保存	不怕冻, 液氮中至少 6 个月内稳定。含较多蛋白质的不纯制剂在液氮中至少一年半内稳定

	名称	保存条件	稳定性
RNA 或 DNA 修饰酶	噬菌体 T4 DNA 连接酶	(1) 在 50% 甘油中 -15°C 保存; (2) 在 10mM 磷酸钾缓冲液 (pH7.6)、1mM 二硫苏糖醇、50mM KCl、50% 甘油中 -20°C 保存在湿冰内; (3) 在 10mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM β-巯基乙醇、50% 甘油中 -5°C 保存。	(1) 6 个月内活力损失不大于 10%; (2) 4 个月内不失活。
	细菌碱性磷酸酯酶	在 10mM Tris-HCl (pH8.0)、120mM NaCl、50% 甘油中 -20°C 保存, 浸于湿冰中	对热较稳定
	S ₁ 核酸酶	在 20mM Tris-HCl (pH7.5)、50mM NaCl、0.1mM ZnCl ₂ 、50% 甘油中 -20°C 保存, 浸于湿冰中	数月内仍稳定
	超螺旋 DNA 松环酶	在 10mM Tris-HCl (pH7.8)、1mM MgCl ₂ 、5mM β-巯基乙醇、50% 甘油中 -20°C 保存, 浸于湿冰中。	
	核酸外切酶 III	在 66 mM KCl、25mM Tris-HCl (pH8)、1mM 二硫苏糖醇、50% 甘油中 -20°C 保存, 浸于湿冰中	
	T4 聚核苷酸激酶	在 50mM Tris-HCl (pH7.6)、30mM KCl、5mM 二硫苏糖醇、5mM MgCl ₂ 、0.1μM ATP、50% 甘油中 -20°C 保存, 浸于湿冰中	
	基质结合的细菌碱性磷酸酶	在 10mM Tris-HCl (pH8)、0.02% NaN ₃ 中 4°C 保存	
	末端脱氧核苷酸转换酶	在 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH7.2)、500 mM NaCl、1mM β-巯基乙醇、50% 甘油中 -20°C 保存, 浸于湿冰中。	
	烟草酸性焦磷酸酶 (TAP)	在 10mM Tris-HCl (pH7.5)、120mM NaCl、10mM β-巯基乙醇、0.01% Triton X-100、50% 甘油中 -20°C 保存, 浸于湿冰中	

保存方法。菌苗、疫苗或抗原、抗体类可直接冻干。有些制剂需加入稳定剂(如蔗糖、明胶)或杀菌剂,然后冷冻(2—10°C或更低)保存。如抗血清加硫酸汞或NaN₃,分别达0.01%和0.1%,在无菌安瓿分装后冰冻保存,则可维持二年以上不变^[38]。

五、小分子生化物质的保存

1. 辅酶 生化中的辅酶约有10多种,多数都对环境敏感,故辅酶类样品应做成干粉,在阴凉处或冰箱内密闭避光保存。有些辅酶如ATP也可加入稳定剂L-精氨酸后进行冻干,保存期可大大延长。液态保存时,对酸碱敏感的FMN、FAD、ATP、NAD等应调节到稳定pH范围。例如ATP、CoA、NAD、NADP在碱性下易分解,应在中、酸性条件下保存; NADH₂、NADPH₂对酸不稳定,保存pH应大于7.5^[39,40]。

2. 维生素^[1,3] 固态下维生素一般很稳定,在干燥器内可长时保存,如维生素C密闭保存数年也无影响。但液态时受环境因素的影响,稳定性大为下降。对光、O₂敏感,需要密闭避光的有:维生素A、B₁、B₂、B₆、B₁₂、C、D₂、E、K、叶酸和类胡萝卜素等,其中维生素C、A、D₂等还对热敏感,液态应低温避光保存。还有些维生素对pH敏感(如B₁、B₂对碱敏感,D₂、叶酸对酸敏感),应调pH保存。易分解的维生素(如C、

D_2 、 D_3) 常以固态保存。

3. 抗菌素^[1-3] 青霉素不稳定，固态也应4°C才能稳定保存，液态更易分解失效。自然界存在有7种青霉素形式，每一种青霉素之间或其盐的稳定性都不完全相同。结晶青霉素盐对热较稳定，但易吸湿，应密闭保存。而液态青霉素盐则易分解，应调pH6—6.8后保存。

链霉素受光、空气影响小，但易吸湿，故干品可以室温下密闭保存，一年内效价不变，数年内也影响不大。液态链霉素也较稳定，加入防腐剂冰箱保存可数月不失效。

四环类抗菌素(金霉素、土霉素、四环素及其衍生物)固态下都较稳定。如金霉素20°C下3—5年内效价不变，一般密闭干燥保存即可。液态受环境因素影响，稳定性差异较大，须结合其性质采取相应保存措施。

4. 激素 激素一般对环境较敏感(尤其在液态下)，除蛋白质激素按蛋白质要求保存外，其它固醇类激素需在干燥器内于阴凉处(或冰箱内)密闭避光保存。液态保存时，应选择最适稳定条件。例如促肾上腺皮质激素液态酸性下较稳定，碱性下则容易失活。胰岛素水溶液易受环境因素(pH、温度、离子强度)影响而聚合或解离，故液态应调弱酸性或在中性缓冲液中冰箱保存^[4]。

5. 其他 如核苷、核苷酸、氨基酸、糖类等对环境要求不高，固态一般只要室温下密闭干燥保存，则可稳定相当长时间不变。保存中要注意防潮，以免造成霉坏(如糖类)。有些物质(如色氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、肝素等)要求避光保存。它们的水溶液稳定性差异较大，如核苷酸酸性下不稳定，易破坏，需在中碱性条件下保存，而嘧啶和嘌呤碱则对酸碱均稳定，应视不同情况具体处置。

参 考 文 献

- [1] 四川医学院：药物化学，人民卫生出版社，第258—297、502页(1979)。
- [2] 上海化工学院等：抗菌素生产工艺学(内部交流教材)，下册，第1、44、60页(1974)
- [3] 张紫洞：药物贮藏法，人民卫生出版社，第42、104、119、137页(1958)
- [4] Haurowitz, F., Chemistry and Biology of Protein, Academic Press, New York (1950)
- [5] Fennema, O., Proteins at Low Temperatures, pp. 1, 35, 55, 159, American Chemical Society, Washington (1979)
- [6] 张龙翔等：生化实验方法和技术，人民教育出版社，第138和169—204页(1982)
- [7] 上海市工业微生物研究所：工业微生物，第五期，第9、35、64页(1971)
- [8] 王世中：免疫化学技术，科学出版社，第9、162页(1980)
- [9] 鲁子贤：蛋白质化学，科学出版社，40页(1981)
- [10] Neurath, H. & Bailey, K., The Protein, Vol. 1, Part A, pp. 35, Academic Press, New York (1953)
- [11] 鲁宝重：酶学概论，科学出版社，54页(1964)
- [12] 清水祥一著，陈石根译：酶分析法的原理和应用，上海科技文献出版社(1982)
- [13] 工业微生物科技情报站，上海工业微生物研究所：工业微生物，第十期，33页(1975)
- [14] G. G. 吉尔鲍特著，缪辉南译：酶法分析，科学出版社，16页(1977)
- [15] Bar-Eli, A. & Katchalski, E., J. B. C., 238, 1690 (1963)
- [16] 藤本正雄：日本特许公报，25, 709(1971)
- [17] 皆川豊作：日本特许公报，2, 873(1965)
- [18] 涂光佛，邹承鲁：生物化学与生物物理学报，5(6), 583(1965)
- [19] Sedwick, W. D. et al., Nucleic acids and protein synthesis, in "Methods in Enzymology", Vol. 29, part E, pp. 99, Eds. Grossman, L. & Moldave, K., Academic Press, New York and London (1974)
- [20] Jakoby, W. B., Enzyme purification and related techniques, in "Methods in Enzymology", Vol. 22, pp. 528, Academic Press, New York (1971)
- [21] Hanafusa, N., Freezing and drying of enzyme protein, in "Freeze-drying of biological materials", International Institute of Refrigeration, pp. 9 (1973)

- [22] 千烟一郎著,胡宝华、吴维江译: 固定化酶,河北人民出版社,139—151页(1981)
- [23] Guilbault, G. G. & Das, J., *Anal. Biochem.*, **33**, 341(1970)
- [24] 中国科学院上海生物化学研究所固相酶组: 生物化学与生物物理学报, **9**(2), 187 (1977)
- [25] Parish, J. H., *Principles and practice of experiments with nucleic acids*, pp. 106, Longman Group Limited, London (1972)
- [26] 蔡妙英: 微生物通报, **10**(1), 24(1983)
- [27] A. M. 怡克拉巴蒂著,姚志建等译: 遗传工程,人民卫生出版社, 204—228页(1981)
- [28] Zubay, G. J., *J. Mol. Biol.*, **4**, 348(1962)
- [29] 蔡良婉等: 生物化学与生物物理学报, **4**(5), 508 (1964)
- [30] 武汉大学生物系: 油脂化学及蓖麻油的综合利用(内部交流教材), 11—22页(1971)
- [31] A. П. 别耶博夫著,谢杰、蔡文樱译: 油脂化学与油脂生产检验,轻工业出版社, 95页 (1958)
- [32] 阿南功一等: 基础生化学实验法(2),抽出、分离、精制,丸善株式会社,第344页 (1974)
- [33] Reiner, J. & Bajaj, Y. P. S., *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, Springer-Verlag (1977)
- [34] G. D. 华斯莱著,何申等译: 动物组织培养技术,科学出版社(1982)
- [35] 罗士韦,唐惕: 细胞生物学杂志 **5**(1), 1 (1983)
- [36] Withers, L. A. & Street, H. E., in "Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application", pp. 226, Eds. Barz, W. et al., Springer-Verlag (1977)
- [37] Reynolds, J. F. & Murashige, T., Cell culture. in "Methods in Enzymology", Vol. 58, pp. 29, Eds. Jakoby, W. B. & Pastan, I. H., Academic Press, New York (1979)
- [38] 史春霖,王小风: 微生物学通报, **7**(6), 277 (1980)
- [39] Guibault, G. G., *Handbook of Enzymatic Methods of Analysis*, Marcel Dekker, New York and Basel (1976)
- [40] 商业部脏器生化制药情报中心站: 动物生化制药学,人民卫生出版社, 125—187页 (1981)
- [41] 蒋传葵等: 工具酶的活力测定,上海科技出版社 (1982)

附录一 各类生化物质制备 及测定的参考资料

根据 R. M. C. Dawson, Daphne C. Elliott, W. H. Elliott and K. M. Jones 等编的“DATA for BIOCHEMICAL RESEARCH”(Second Edition, Oxford University press, 1969.) 译出，并在内容上作了删减。

溶解度缩写符号：

- V. S. Very soluble
- Sl. S Slightly soluble
- Sp. S. Sparingly soluble
- i. insoluble

文献及著作：

- J. A. C. S. *Journal of the American chemical Society.*
- P. S. E. B. M. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.*
- Ber. *Chemische Berichte* (Prior to 1947 *Berichte der deutschen Chemischen Gesellschaft*).
- C. A. *Chemical Abstracts.*
- Biochem. Preps. *Biochemical preparations* (Wiley & Sons Inc., N. Y.).
- J. B. C. *Journal of Biological Chemistry.*
- B. J. *Biochemical Journal.*
- Arch. B. B. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*
- Arch. B. *Archives of Biochemistry.*
- Z. P. C. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie.*
- B. Z. *Biochemische Zeitschrift.*
- Meth. Enzymol. *Methods of Enzymology*, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Academic Press).
- Meth. Biochem. Anal. *Methods of Biochemical Analysis*, ed. D. Glick (Wiley-Interscience Inc., N. Y.).
- Org. Synth. Coll. *Collective Volumes of Organic Syntheses.*
- J. C. S. *Journal of the Chemical Society.*
- B. B. A. *Biochimica et Biophysica Acta.*
- B. B. R. C. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*
- F. J. Bates et al., Polarimetry, Saccharimetry and the sugars, U. S. Department of Commerce, National Bureau of Standards, Washington, D. C. (1942). 缩写：“Bates et al.”
- P. A. Levene and L. W. Bass, Nucleic Acids, Chemical Catalog Co., N. Y. (1931). 缩写：“Levene and Bass”
- Modern Methods: Modern Methods of Plant Analysis, eds. K. Paech and M. V. Tracey, Vol. 4, Springer-Verlag, Berlin (1955).
- M. Freed (ed.) for the Association of Official Vitamin Chemists, *Methods of Vitamin Assay*, 3rd ed., Interscience (1966).
- P. György and W. N. Pearson (eds.), *The Vitamins*, Vols. 6 and 7, Academic (1967).
- Vitamins and Hormones, Academic Press, a review serial published annually, Vol. 1(1943), Vol. 26 (1968)
- The Nucleic Acids, eds. E. Chargaff and J. N. Davidson, Vol. 1, Academic Press, N. Y. (1955).

1. 糖类及有关化合物的制备

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
D-阿拉伯糖 (D-Arabinose)	150.1	S. 水 Sl. S. 乙醇 i. 乙醚	J. A. C. S. 72, 4546(1950) Org. Synth. Coll. 3, 101(1955)	戊糖分析测定一般方法 见下述参考文献
D-来苏糖 (D-Lyxose)	150.1	S. 水 2,1 ⁷ 乙醇	J. A. C. S. 72, 4546(1950) Bates et al., p. 469	Meth. Biochem. Anal. 2, 313(1955) J. B. C. 167, 369 (1947)
L-来苏糖酸 (L-Lyxonic acid)	166.1	S. 水	J. B. C. 235, 2518(1960)	J. B. C. 194, 261 (1952)
核糖醇 (Ribitol)	152.1	S. 水, 乙醇 i. 乙醚	J. A. C. S. 73, 4691(1951) J. C. S. 1949, S44	J. B. C. 205, 661 (1953)
D-核糖 (D-Ribose)	150.1	S. 水 Sl. S. 乙醇	Adv. Carbohyd. Chem. 6, 135 (1951) Bates et al., p. 476	B. J. 58, 288 (1954)
2-脱氧核糖 (2-Deoxy-D-Ribose)	134.1	S. 水 Sl. S. 异丙醇	Chemey Ind. 1955, 92 Biochem. Preps. 5, 75(1957)	The Nucleic Acids, eds. Chargaff and Davidson, Vol. 1, p. 285
D-核酮糖 (D-Ribulose)	150.1		Helv. Chim. Acta. 18, 80(1935)	J. B. C. 204, 1011 (1953) J. B. C. 201, 71 (1953)
D-木酮糖 (D-Xylulose)	150.1	S. 水	J. A. C. S. 60, 1201 (1938) J. B. C. 115, 731 (1936)	J. A. C. S. 76, 5889 (1954) B. J. 63, 542 (1956)
L-木酮糖 (L-Xylulose)	150.1	S. 水	J. B. C. 215, 677 (1955) Ber. 68, 118 (1935)	同 D-木酮糖
D-岩藻糖 (D-Fucose)	164.2	S. 水 i. 乙醚 Sl. S. 乙醇	J. C. S. 1945, 746	以下为分析甲基戊糖一般方法参考文献 J. B. C. 175, 595 (1948)
毛地黄毒素糖 (Digitoxose)	148.1	S. 乙醇, 水 i. 乙醚	Meth. Carb. Chem. Vol. 1, p. 240 (1962)	J. B. C. 192, 579 (1951) Analyst, 80, 268(1955)
L-鼠李糖 (L-Rhamnose)	164.2	S. 水, 甲醇, 乙醇 i. 苯, 乙醚	J. A. C. S. 43, 127 (1921) Bates et al., p. 475	

己糖分析测定一般参考文献: J. B. C. 220, 583 (1956)

B. J. 58, 288 (1954)

J. Physiol. 132, 289 (1956)

J. B. C. 195, 19 (1952)

(酮糖): J. B. C. 192, 583 (1951)

P. S. E. B. M. 74, 117 (1950)

B. J. 63, 543 (1956)

(己糖醛酸): Analyst. Chem. 28, 1098 (1956)

N-乙酰-半乳糖胺 (N-Acetyl D-galactosamine)	221.2	S. 水	J. A. C. S. 76, 301 (1954)	J. B. C. 217, 959 (1955) B. J. 51, 379 (1952)
N-乙酰-D-神经 氨(糖)酸 (N-Acetyl-neurameric acid)	309.2	S. 水, 甲醇 Sl. S. 乙醇 i. 乙醚, 丙酮, 氯仿	Biochem. Preps. 7, 1 (1960) B. B. A. 39, 161 (1960)	见上述一般文献

续 表

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
D-果糖 (D-Fructose)	180.2	375 ²⁰ 水 S. 甲醇, 乙醇	Adv. Carbohyd. Chem. 7, 53 (1952)	J. B. C. 127, 601 (1939) J. B. C. 192, 583 (1951)
D-半乳糖胺盐酸盐 (D-Galactosamine-HCl)	215.6	S. 水	J. A. C. S. 76, 301 (1954) Adv. Carbohyd. chem. 7, 247 (1952)	Analyt. Chem. 28, 1743 (1956)
D-半乳糖 (D-Galactose)	180.2	10°, 68 ²³ 水 5.45 ²³ 比旋 Sl. S. 甲醇	Bates et al., p. 462	Analyt. Chem. 27, 857 (1955)
D-氨基葡萄糖 (D-Glucosamine)	179.2	V. S. 水 S. 热甲醇 Sl. S. 乙醇 i. 乙醚, 氯仿	Adv. Carbohyd. Chem. 7, 247 (1952)	Analyt. Chem. 28, 1743 (1956) B. J. 61, 586 (1955) Meth. Biochem. Anal. 6, 289 (1958)
L-古洛糖 (L-Gulose)	180.2	S. 水 Sl. S. 乙醇	J. A. C. S. 67, 1713 (1945)	
D-甘露糖胺 (D-Mannosamine)	179.2	S. 水, 甲醇	J. A. C. S. 81, 2403 (1959)	
D-甘露糖 (D-Mannose)	180.2	248 ¹⁷ 水 i. 乙醚	Bates et al., p. 471	
L-山梨糖 (L-Sorbose)	180.2	55 ¹⁷ 水 Sp. S. 热乙醇 甲醇	Adv. Carbohyd. Chem. 7, 99 (1952) Bates et al., p. 479	

庚糖一般分析测定方法参考文献: J. B. C. 204, 983 (1953)
J. B. C. 205, 661 (1953)

D- α -葡萄糖 (D- α -Glucoheptose)	210.2	9.5. 水 Sl. S. 乙醇	J. C. S. 1931, 2864
D-甘露庚酮糖 (D-manno-Heptulose)	210.2	S. 水 Sp. S. 乙醇	J. A. C. S. 61, 1654 (1939)
景天庚酮糖 (Sedoheptulose)	210.2	S. 水 Sp. S. 乙醇	J. A. C. S. 78, 4717 (1956)

二糖一般分析测定方法参考文献: B. J. 58, 288 (1954)

纤维二糖 (Celllobiose)	342.3	S. 水 i. 乙醇乙醚	Org. Synth. Coll. 2, 122 (1943) Bates et al., p. 459
异麦芽糖 (Isomaltose)	342.3	S. 水, 甲醇	B. J. 67, 49 (1957) J. A. C. S. 75, 5911 (1953)
曲二糖 (Kojibiose)	342.3	S. 水	J. B. C. 196, 265 (1952) Nature, Lond. 182, 1303 (1958); 189, 753 (1961); 191, 278 (1961)
乳糖 (Lactose)	342.3	21, 6 ²³ 水 Sl. S. 冰醋酸 i. 甲醇 乙醇, 乙醚	Adv. Carbohyd. Chem. 16, 159 (1961)
昆布二糖 (Laminaribiose)	342.3	S. 水, 甲醇	J. C. S. 1952, 1243 J. C. S. 1958, 724, 729

续 表

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
麦芽糖 (Maltose)	342.3	108 ²⁰ 水 S. S. 乙醇 i. 乙醚	Bates et al., p. 470	
密二糖 (Melibiose)	342.3	S. 水 S. S. 乙醇	Adv. Carbohyd. Chem. 9, 165 (1954) Bates et al., p. 473	
松二糖 (Turanose)	342.3	S. 水 S. S. 甲醇	Adv. Carbohyd. Chem. 2, 1 (1946) J. A. C. S. 52, 2522 (1930)	
纤维三糖 (Cellotriose)	504.4	S. 水 S. S. 甲醇	J. A. C. S. 74, 5331 (1952)	
蔗果三糖 (Kestose)	504.4	i. 乙醇 S. 水	Meth. Carb. Chem., Vol. 1, p. 360 (1962)	
昆布三糖 (Laminaritriose)	504.4	S. 水	J. C. S. 1958, 724	
麦芽三糖 (Maltotriose)	504.4	S. 水	J. C. S. 1953, 1293 J. B. C. 205, 75 (1953) J. A. C. S. 74, 3612 (1952)	
6- α -葡萄糖基 麦芽糖 (Panose)	504.4	S. 水	J. A. C. S. 73, 2547 (1951)	Analyt. Chem. 25, 231 (1953)
密三糖 (Raffinose)	504.4	14.3 ²⁰ 水 9.8 甲醇 V. S. 吡啶 i. 乙醇	Adv. Carbohyd. Chem. 9, 167 (1954) Bates et al., p. 475	Meth. Biochem. Anal. 1, 308 (1954)
来苏四糖 (Stachyose)	666.6	S. 水	Chem. Ind. 1961, 475 Adv. Carbohyd. Chem. 9, 149 (1954)	
毛蕊花糖 (Verbascose)	828.8	S. 水	Adv. Carbohyd. Chem. 9, 149 (1954)	

2. 脂类及长链脂肪酸化合物的制备

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
花生酸 (Arachidic acid)	312.5	0.45 ²⁰ 乙醇 S. 氯仿, 苯, 乙醚	J. Soc. Chem. Ind., Lond. 44, 219 (1925) J. B. C. 59, 905 (1924) Ber. 64, 2504 (1964)	Meth. Biochem. Anal. 8, 1 (1960) T. P. Hilditch and P. N. Williams, The Chemical Constitution of Natural Fats, 4th ed., p. 678, Chapman and Hall (1964)
花生四烯酸 (Arachidonic acid)	304.5	S. 乙醚 i. 水	J. B. C. 80, 455 (1928) B. J. 34, 879 (1940) J. B. C. 142, 672 (1942)	

续 表

名 称	分子量	溶解度	制 备 方 法	分 析 方 法
心磷脂 (Cardiolipin)	(508.3)	i. 水 S. 丙酮, 氯仿, 残基 乙醇, 乙醚	J. B. C. 161 , 71 (1945) B. J. 70 , 409 (1958)	B. J. 84 , 497 (1962) B. B. A. 84 , 109 (1964)
脑磷脂 (Cephalin)	(296.2)	S. 甲醇, 乙醇, 十脂肪酸 氯仿, 苯 残基 i. 丙酮	J. B. C. 146 , 35 (1942) B. J. 60 , 353 (1955) Biochem. Preps. 5 , 5 (1957) B. J. 80 , 557 (1961)	J. B. C. 157 , 585 (1945) J. B. C. 192 , 465 (1951) B. J. 84 , 497 (1962)
脑苷脂类 (Cerebrosides)	(488.6)	I. 水, 乙醚 S. 乙醇 十脂肪酸 S. 氨啶, 残基 丙酮, 冰醋酸, 氯仿	Z. P. C. 145 , 144 (1925) J. B. C. 169 , 77 (1947) J. B. C. 219 , 977 (1956) Biochem. Preps. 7 , 31 (1960) J. Lipid Res. 2 , 228 (1961)	J. B. C. 141 , 545 (1941) J. B. C. 219 , 977 (1956) Meth. Biochem. Anal. 6 , 178 (1958)
胆甾醇 (Cholesterol)	386.6	S. 乙醚 氯仿, 苯, 氨啶, 热乙醇 Sp. S. 水	Z. P. C. 192 , 77 (1930) Z. P. C. 241 , 81 (1936)	Meth. Biochem. Anal. 10 , 263 (1962) J. Lipid Res. 3 , 283 (1962)
粪甾醇 (Coprosterol)	388.6	S. 乙醚, 氯 仿, 苯 S. 甲醇 i. 水	Z. P. C. 223 , 249 (1934); 225 , 197 (1934) J. Lipid Res. 4 , 337 (1963)	R. P. Cook, Cholesterol, pp. 117, 481, Academic Press (1958)
二氢(神经)鞘氨醇 (Dihydrophosphino- gosine)	301.5	S. 乙醇 乙醚	J. B. C. 170 , 269 (1947) J. Neurochem. 6 , 112 (1969)	J. Lipid Res., 1 , 40 (1959)
桐 酸 (Elaeostearic acid)	278.4	S. 乙醚, 热冰 醋酸 i. 水	J. A. C. S. 56 , 898 (1934) J. A. C. S. 48 , 968 (1926) (顺式)	B. J. 59 , 309 (1955) Meth. Biochem. Anal. 8 , 1 (1960)
芥子酸 (Erucic acid)	338.6	S. 乙醇, 乙醚 (顺式) S. 乙醇 (反式) S. 乙醚 (反式)	J. B. C. 200 , 287 (1953) J. A. C. S. 78 , 3735 (1956) J. Lipid Res. 2 , 215, 223 (1961)	J. A. C. S. 48 , 968 (1926) Meth. Biochem. Anal. 8 , 1 (1960) B. B. A. 44 , 49 (1960)
半乳糖甘油脂 (Galacto-glycerides)		(i) S. 甲醇 (ii) S. 水	Z. P. C. 278 , 1 (1943) J. Biochem., Tokyo, 43 , 63 (1956) B. B. A. 53 , 422 (1961) B. B. A. 60 , 350 (1962) Z. P. C. 327 , 249 (1962)	B. J. 82 , 527 (1962) J. Lipid Res. 3 , 269 (1962)
神经营节苷脂 (Gangliosides)		i. 水 S. 乙醇, 氯仿 乙醚	Chem. Zent. Bl. 1 , 2971 (1935)	B. J. 62 , 455 (1956) J. Am. Oil Chem. Soc. 37 , 7 (1960)
α -单油酸甘油酯 (α -Monolein)	356.5	i. 水 S. 乙醇, 氯仿 乙醚	J. B. C. 128 , 475 (1939)	见单油酸甘油脂
α -单棕榈酸甘油酯 (α -Monopalmitin)	330.4	i. 水 S. 乙醇 2.75% 乙醚		

续 表

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
β -单棕榈酸甘油酯 (β -Monopalmitin)	330.4	i. 水 S. 乙醇	J. A. C. S. 56, 1724 (1934)	见单油酸甘油脂
α -单硬脂酸甘油脂 (α -Monostearin)	358.5	分散于水中 Sl. s. 乙醇 S. 热乙醇, 热乙醚, 氯仿	J. B. C. 128, 475 (1939)	同 上
β -单硬脂酸甘油脂 (β -Monostearin)	358.5	S. 热乙醇 热乙醚	J. A. C. S. 56, 1724 (1934)	同 上
三月桂酸甘油脂 (Trilaurin)	639.0	i. 水 Sl. s. 乙醇 S. 氯仿, 乙醚, 苯	J. A. C. S. 51, 866 (1929)	Chem. Rev. 29, 333 (1941)
DL-2-羟基硬脂酸 (DL-2-Hydroxystearic acid)	300.4	i. 水 V. S. 热苯 S. 乙醇, 乙醚	J. C. S. 1954, 177. B. B. A. 45, 402 (1960) J. B. C. 236, 1912 (1961)	Aust. J. Chem. 13, 80 (1960)
羊毛甾醇 (Lanosterol)	426.7	i. 水 S. 脂肪溶剂	Helv. Chim. Acta. 27, 472 (1944); 28, 759 (1945); 29, 204 (1946)	见粪甾醇
月桂酸 (Lauric acid)	200.3	V. S. 乙醚, 冰醋酸, 甲醇, 乙醇等 0.0055 水	J. Soc. Chem. Ind., Lond., 49, 138T (1930) J. C. S. 1936, 283.	B. J. 63, 144 (1956)
卵磷脂 (Lecithin)	(329.3)	I. 丙酮 S. 乙醇, 乙醚 氯仿, 四氯化碳, 苯	J. B. C. 188, 471 (1950) Biochem. Preps. 4, 12 (1955) B. J. 60, 353 (1955) B. J. 88, 414 (1963)	J. B. C. 169, 137 (1947) B. J. 84, 497 (1962)
亚油酸 (Linoleic acid)	280.4	i. 水 V. S. 乙醇, 乙醚	Biochem. Preps. 4, 86 (1955)	B. J. 59, 309 (1955)
溶血卵磷脂 (Lysolecithin (β))		i. 乙醚 s. 乙醇, 冰醋酸, 氯仿 Sp. S. 丙酮 在水中乳化	J. B. C. 129, 619 (1939) J. B. C. 211, 321 (1954) J. B. C. 206, 431 (1954) B. B. A. 30, 187 (1958)	J. B. C. 206, 443; 647 (1954) J. Lipid Res. 3, 1; 467 (1962)
油 酸 (Oleic acid)	282.5	i. 水 S. 乙醇, 苯, 氯仿, 乙醚, 甲醇, 丙酮	J. A. C. S. 56, 1563 (1934) J. C. S. 1939, 974. J. B. C. 154, 437 (1944) Biochem. Preps. 2, 100 (1952); 9, 113 (1962)	Analyt. Chem. 22, 1261 (1950) B. J. 59, 309 (1954)
棕榈酸 (Palmitic acid)	256.4	i. 水 S. 乙醇, 苯, 氯仿, 乙醚, 甲醇, 丙酮	Ber. 21, 2265 (1888) Ber. 24, 936 (1891) J. C. S. 1931, 802. Org. Synth. Coll. 3, 607 (1955)	B. J. 63, 144 (1956)
磷脂酸 Phosphatidic acid	226.1	i. 水, 乙醇 S. 丙酮, 乙醚, 氯仿	B. B. A. 41, 45 (1960) Can. J. Biochem. physiol. 33, 575 (1955)	B. J. 84, 497 (1962)

续 表

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
磷脂酰甘油 (Phosphatidyl-glycerol)	300.1	在水中乳化 S. 乙醇, 乙醚, 氯仿,丙酮,苯, 甲醇	B. B. A. 27 , 189 (1958) B. J. 88 , 42p (1963) B. B. A. 84 , 35 (1964)	B. J. 84 , 497 (1962)
磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidyl-Serine)	313.2	在水中乳化 i. 乙醇, 甲醇,丙酮	B. J. 85 , 251 (1962) B. B. A. 30 , 41 (1958) Nature, Lond. 200 , 887 (1963)	J. B. C. 192 , 465 (1951) B. J. 84 , 497 (1962)
缩醛磷脂 (Plasmalogens)	(a)267.2 (b)240.2	S. 氯仿,乙醚 (b)i: 水 Sl.s. 乙醇, 乙醚,丙酮苯 残基 S. 热甲醇,热 乙醇,氯仿 十脂肪醇 残基	(a) B. J. 70 , 409 (1958) J. B. C. 237 , 329 (1962) J. Neurochem. 10 , 941 (1963) (b) J. B. C. 225 , 859 (1957) B. J. 75 , 251 (1960)	J. Lipid Res. 3 , 467 (1962) J. B. C. 219 , 39 (1956) J. B. C. 217 , 199 (1955) B. B. A. 38 , 340 (1960) B. J. 84 , 497 (1962) Prog. Chem. Fats 6 , 1 (1963)
谷甾醇 (Sitosterols)	(α) 412.7 (β) 414.7	(α) S. 氯仿 乙醚 (β) S. 氯仿	(α) J. A. C. S. 58 , 2446 (1936) (β) Ber. 64 , 2167 (1931) J. A. C. S. 66 , 489 (1944)	
神经鞘磷脂 (Sphingomyelin)	(509.6)	i. 乙醚, 丙 酮, 水 S. 苯, 氯仿 热乙醇	J. B. C. 166 , 677 (1946) J. B. C. 232 , 63 (1958) Biochem. Preps. 8 , 121 (1961)	B. J. 56 , 621 (1954) B. J. 84 , 497 (1962)
鲨烯 (Squalene)	410.7	S. 乙醚, 氯仿 Sp. S. 乙醇, 冰醋酸	J. C. S. 1926, 1631. J. A. C. S. 74 , 4321 (1952)	J. A. C. S. 74 , 4321 (1952)
硬脂酸 (Stearic acid)	284.4	i. 水 S. 乙醚, 氯 仿, 苯, 乙醇	Ber. 17 , 1627 (1884) J. Soc. Chem. Ind., Lond. 43 , 346T (1924) J. A. C. S. 62 , 230 (1940) J. C. S. 1931, 802. Biochem. Preps. 7 , 84 (1960)	B. J. 63 , 144 (1956)
11-十八(碳)烯酸 (Vaccenic acid)	282.4	S. 氯仿 丙酮	J. A. C. S. 70 , 1102 (1948) J. C. S. 1950, 3484.	J. B. C. 169 , 227 (1947)

3. 维生素及辅酶类的制备

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
乙酰辅酶 A Acetylcoenzyme A	809.6	S. 水	Meth. Enzymol. 3 , 931 (1957) J. A. C. S. 74 , 3205 (1952) Biochem. Preps. 5 , 27 (1957)	Meth. Enzymol. 3 , 935, 938 (1957) B. B. R. C. 10 , 333 (1963)
抗坏血酸 (维生素 C) Ascorbic Acid	176.1	33.3 水; 2 乙醇 i. 乙醚, 氯仿	B. J. 27 , 279 (1933) J. B. C. 97 , 325 (1932)	Methods of Vitamin Assay, 3rd ed., p. 287 (1966)

续 表

名 称	分子量	溶解度	制 备 方 法	分 析 方法
辅酶 A Coenzyme A	767.6	S. 水 i. 丙酮,乙醚	Meth. Enzymol. 3, 907 (1957) J. A. C. S. 83, 663 (1961)	Meth. biochem. Anal. 2, 189 (1955)
氯钴胺素 (维生素 B ₁₂) Cyanocobalamin	1355.4	1.2 水; S. 乙醇,酚, 脂肪酸; i. 吡啶	Science 107, 396 (1948) Proc. R. Soc. B136 592 (1940—50)	Meth. biochem. Anal. 2, 189 (1955)
辅酶 B ₁₂ Coenzyme B ₁₂	1579.6	2.6 ²⁴ 水 S. 乙醇,酚	Biochem. Preps. 10, 27 (1963), 12, 124, (1968)	The Vitamins. 2nd ed. Vol. 7, p. 277 (1967)
DMBC 辅酶		i. 丙酮,乙醚	Arch. B. B. 92, 381 (1961) J. C. S. 1963, 4146 J. B. C. 236, 2119 (1961)	J. B. C. 236, 2347, pc (1961)
多萜醇 Dolichol	1382.4	S. 乙醚 Sl. s. 乙醇	Nature, Lond. 186, 470 (1960)	B. J. 82, 454 (1962)
i. 水			B. J. 88, 470 (1963)	
麦角固醇 Ergosterol	396.7	S. 热氯仿,苯; Sl. s. 甲醇, 乙醇,乙醚; i. 水	J. A. C. S. 67, 609 (1945) Analyst 78, 509 (1953)	Analyst 78, 509, 514, 519, 524 (1953)
脂酰辅酶 A Fatty acyl coenzyme A	1006 (十六酰)	脂肪酸链愈 长,溶于水愈少	十六酰-辅酶 A: Biochem Preps. 7, 80 (1960)	Meth. Enzymol. 3, 931 (1957)
黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)	785.6	V. S. 水; S. 吡啶酚;	Meth. Enzymol. 3, 950 (1957)	J. B. C. 204, 329 (1953)
Flavin adenine Dinucleotide		i. 乙醇,乙醚, 丙酮,氯仿	Biochem. Prep. 7, 51 (1960)	Meth. Enzymol. 3, 955, 960 (1957)
黄素单核苷酸 FMN	456.4	i. 丙酮, 乙醚,氯仿;	Meth. Enzymol. 3, 957 (1957)	J. B. C. 223, 559 (1956)
Flavin Mono- nucleotide		S. 水,冰醋 酸,吡啶,酚;	J. C. S. 1950, 3295	Meth. biochem. Anal. 10, 319 (1962)
肌 醇 Inositol	180.2	14 ²⁵ 水; Sl. s. 乙醇	J. B. C. 139, 29 (1941)	Meth. biochem. Anal. 7, 115 (1959)
硫辛酸 Lipoic acid	206.3	V. S. 苯,乙 醇,甲醇; Sl. s. 石油醚;	Science 114, 93 (1951) J. A. C. S. 76, 1828 (1954)	B. J. 67, 523 (1957)
		i. 水	J. A. C. S. 77, 416, 5144 (1955)	Meth. biochem. Anal. 3, 23 (1956)
尼克酰胺 (维生素 PP) Nicotinamide	122.1	100 水; Sl. s. 苯,乙醚		Meth. Enzymol. 3, 941 (1957)
尼克酰胺腺嘌呤二 核苷酸(辅酶 I) Nicotinamide adeni- ne dinucleotide NAD;	663.4	s. 水	Biochem. Prep. 3, 20 (1953) J. B. C. 239, pc3598 (1964)	The Vitamins, 2nd ed., vol. 7, p. 137 (1967)
DPN. coenzyme I			Biochem. Prep. 11, 84 (1966) Meth. Enzymol. 3, 876 (1957)	Meth. Enzymol. 3, 890 (1957)
				Meth. Enzymol. 6, 792 (1963)

续 表

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (辅酶 II)	743.4	s. 水	Biochem. Preps. 3, 24 (1953) Meth. Enzymol. 3, 879 (1957) Biochem. Preps. 11, 87 (1966)	Meth. Enzymol. 3, 890 (1957) Meth. Enzymol. 6, 792 (1963)
Coenzyme II NADP				
蝶酰谷氨酸; 叶酸, 维生素 Bc	441.4	Sl.s. 冰醋酸; i. 许多有机溶剂;	J. A. C. S. 70, 3 (1948) J. A. C. S. 77, 6365 (1955)	J. B. C. 205, 361 (1953) The Vitamins, 2nd ed., vol. 7, p. 243 (1967)
Pteroylglutamic acid		0.05 ¹⁰⁰ 水		
N ⁵ , N ¹⁰ -甲基四氢叶酸	457.4		Meth. Enzymol. 6, 806 (1963)	Meth. Enzymol. 6, 809 (1963)
N ⁵ , N ¹⁰ -Methenyl-tetrahydropteroyl-glutamic acid			J. B. C. 238, 1498 (1963)	
N ⁵ -甲基四氢叶酸 (N ⁵ -甲基四氢蝶酰谷氨酸)	459.5	S. 水	J. A. C. S. 82, 4921 (1960)	
N ⁵ -Methyltetrahydropteroylglutamic acid				
吡哆醇盐酸盐 (维生素 B ₆)	205.7	22 水; Sl.s. 丙酮;	J. A. C. S. 61, 1245 (1939)	Meth. biochem. Anal. 12, 183 (1964)
Pyridoxol hydrochloride		i. 乙醚		
磷酸吡哆醛	247.1	S. 水	Biochem. Preps. 3, 34 (1953)	Meth. biochem. Anal. 12, 183 (1964)
Pyridoxal phosphate			Sl.s. 甲醇	Analyt. Biochem. 7, 335 (1964)
		i. 氯仿, 丙酮, 苯	Meth. Enzymol. 3, 965 (1957)	
核黄素 (维生素 B ₂)	376.4	0.01 ¹⁰⁰ 水; V.S. 冰醋酸;	Ber. 66, 315 (1933)	The Vitamins. 2nd ed., vol. 7, p. 99 (1967)
Riboflavin		i. 乙醚, 氯仿, 苯		
琥珀酰-辅酶 A Succinyl coenzyme A	867.6	s. 水	J. A. C. S. 75, 2520 (1953) Biochem. Preps. 5, 30 (1957)	
硫胺素盐酸盐 (维生素 B ₁ 盐酸盐)	337.3	100 水; 0.35 乙醇;	J. A. C. S. 59, 1052 (1937) J. C. S. 1937, 364	Meth. biochem. Anal. 6, 191 (1958)
Thiamin chloride		S. 甲醇		The Vitamins, 2nd ed., vol. 7, p. 53 (1967)
硫胺素焦磷酸, 碱化辅酶 (TPP) (Cl ⁻)	460.8	i. 乙醚, 氯仿	Helv. chim. Acta 29, 1909 (1946)	B. J. 62, 601 (1956)
Thiamin pyrophosphate		S. 水	Helv. chim. Acta 32, 1478 (1949)	B. B. A. 64, 13 (1962)
生育酚	430.7	S. 丙酮, 乙醇, 氯仿, 乙醚;	J. B. C. 113, 319 (1936) B. J. 32, 1953 (1938)	Vitams. Horm. 20, 407 (1962)
α-Tocopherol		i. 水	J. A. C. S. 65, 918 (1943)	The Vitamins, 2nd ed., vol. 6, p. 291 (1967)
			Vitams. Horm. 20, 389 (1962)	

续 表

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
泛 酮 (辅酶 Q ₁₀) Ubiquinone-10	863.4	S. 乙醇, 乙醚, 轻质石油醚; i. 水	Biochem. Preps., 9, 30 (1962) J. B. C. 234, 2169 (1959) B. B. A. 32, 73 (1959) J. A. C. S. 82, 1647 (1960)	
维生素 A ₁ (全反型) Vitamin A ₁	286.5	S. 乙醇, 甲醇, 氯仿, 乙醚; i. 水	The Vitamins, 2nd ed., vol. 1, p. 1 (1967) Vitams Horm. 18, 295 (1960)	The Vitamins, 2nd ed., vol. 6, p. 139 (1967) Meth. biochem. Anal. 4, 43 (1957); 15, 1 (1967)
维生素 A ₂ (全反型) Vitamin A ₂	284.4	S. 乙醇, 氯仿, 乙醚, 环己烷; i. 水	B. J. 52, 535 (1952) J. C. S. 1952, 2657, 1955, 2763 Vitams Horm. 18, 295 (1960)	The Vitamins, 2nd ed., vol. 6, p. 139 Meth. biochem. Anal. 4, 43 (1957); 15, 1 (1967)
维生素 D ₂ Vitamin D ₂	396.7	28 ²⁶ 乙醇; 25 ²⁶ 丙酮; S. 乙醚; i. 水	B. J. 49, 45 (1951) J. A. C. S. 67, 609 (1945)	The Vitamins, 2nd ed., vol. 6, p. 211 (1967) B. J. 49, 36, 45, 54, 232, 243 (1951)
维生素 D ₃ Vitamin D ₃	384.7	S. 乙醇, 丙 酮, 氯仿; i. 水	J. A. C. S. 67, 609 (1954)	The Vitamins, 2nd ed., vol. 6, p. 211 (1967)
维生素 K ₁ Vitamin K ₁	450.7	S. 乙醇, 丙 酮, 苯, 乙醚; i. 水	Helv. chim. Acta. 22, 310,945, 1464 (1939) J. A. C. S. 76, 4592 (1954)	Meth. biochem. Anal. 11, 279 (1963) The Vitamins, 2nd ed vol. 6, p. 245 (1967)

4. 核苷、核苷酸及其衍生物的制备

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
腺嘌呤 Adenine	135.1	0.09 ²³ , 2.5 ¹⁰⁰ 水; Sl.s. 乙醇, i. 乙醚, 氯仿	*Levene and Bass, p. 114 8- ¹⁴ C. Biochem. Preps. 5, 62 (1957)	Meth. biochem. Anal. 3, 97 (1956)
腺嘌呤核苷 Adenosine	267.2	S. 水; Sl.s. 乙醇	J. B. C. 237, 2283 (1962) J. A. C. S. 73, 1650 (1951) Levene and Bass, p. 163	Meth. biochem. Anal. 6, 79 (1958) J. B. C. 167, 445 (1947) Arch. B. 25, 347 (1950)
腺苷-3', 5'-磷酸 (c'AMP) Adenosine-3', 5'-cyclicphos-phate	329.2	S. 水	J. B. C. 232, 1065, 1077 (1958) J. B. C. 224, 463 (1957) J. A. C. S. 79, 3608 (1957) J. A. C. S. 83, 698 (1961) J. Org. Chem. 31, 3247 (1966)	Analyt. Biochem. 13 71 (1965)
腺苷-5'-二磷酸 (ADP) Adenosine- 5'-diphosphate	427.2		Biochem. Preps. 1, 1 (1949) B. B. A. 91, 1 (1964) Ber. 95, 1664 (1962) Ber. 98, 1045 (1965)	Meth. biochem. Anal. 1, 341 (1954)

续 表

名 称	分子量	溶解度	制 备 方 法	分 析 方法
腺苷-5'-磷酸 Adenosine- 5'-phosphate	347.2	S. 热水	Meth. Enzymol. 6 , 645 (1963) Biochem. Preps. 9 , 5 (1962) B. J. 58 , 503 (1954) B. B. R. C. 24 , 872 (1966) Biochem. Preps. 1 , 5 (1949) Arch. B. B. 62 , 253 (1956) B. B. A. 91 , 1 (1964) J. A. C. S. 87 , 2265 (1965) B. B. R. C. 9 , 556 (1962) Meth. Enzymol. 10 , 702, 773 (1967)	J. B. C. 167 , 445 (1947) Meth. Enzymol. 10 , 474 (1967)
腺苷-5'-三磷酸 (ATP) Adenosine- 5'-triphosphate	507.2			Analyt. Biochem. 14 , 261 17 , 456 (1966) Meth. Enzymol. 10 , 474 (1967)
胞嘧啶核苷 Cytidine	243.2	S. 水 Sl.s. 乙醇	Levene and Bass, p. 164 J. B. C. 237 , 2283 (1962) J. C. S. 1950, 2084	
胞苷-5'-二磷酸 (CDP) Cytidine-5'- diphosphate	403.2		Arch. B. B. 35 , 465 (1952) J. B. C. 209 , 23, 41 (1954) J. A. C. S. 83 , 649 (1961)	
胞苷-5'-磷酸 Cytidine-5'- phosphate	323.2	Arch. B. B.	Arch. B. B. 35 , 465 (1952) B. B. R. C. 24 , 872 (1966)	The Nucleic Acids, Vol. 1 , p. 211 (1955)
胞苷-5'-三磷酸 (CTP) Cytidine-5'- triphosphate	483.2		J. B. C. 209 , 23, 41 (1954) B. B. A. 91 , 1 (1964) Biochem. Preps. 9 , 120 (1962) J. A. C. S. 37 , 2265 (1965)	
鸟嘌呤核苷 Guanosine	283.2	0.08 ¹⁸ , 3.0 ¹⁰⁰ 水; S. 稀酸碱, 热冰醋酸 i. 乙醚, 乙 醇, 氯仿, 苯	Levene and Bass, p. 163 Ber. 74 , 694 (1941) J. B. C. 237 , 2283 (1962) J. C. S. 1958, 1593	J. B. C. 167 , 429 (1947)
鸟苷-5'-二磷酸 (5'-GDP) Guanosine-5'- diphosphate	443.2		J. B. C. 209 , 23, 41 (1954) J. B. C. 218 , 521 (1956) Meth. Enzymol. 6 , 645 (1963) Ber. 98 , 1045 (1965) B. B. A. 91 , 1 (1964)	J. B. C. 218 , 505 (1956)
鸟苷-5'-磷酸 (5'-AMP) Guanosine-5'- phosphate	363.2		J. B. C. 209 , 23, 41 (1954) Meth. Enzymol. 6 , 645 (1963) B. B. R. C. 24 , 872 (1966)	
鸟苷-5'-三磷酸 (GTP) Guanosine-5'- triphosphate	523.2		J. B. C. 209 , 23, 41 (1954) J. B. C. 218 , 521 (1956) B. B. A. 91 , 1 (1964) Biochem. Preps. 9 , 120 (1962) J. A. C. S. 87 , 2265 (1965)	J. B. C. 209 , 41 (1954)

续 表

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
次黄嘌呤核苷(肌苷)	268.2	1.6 ²⁰ 水 V. Sl. s.	Ber, 42 , 336 (1909) B. B. R. C. 13 , 394 (1963)	J. B. C. 167 , 429, 477 (1947)
Inosine		乙醇	J. B. C. 167 , 477 (1947)	
次黄嘌呤核苷酸(肌苷酸)	348.2	S. 水 甲酸 V. Sl. s.	B. J. 36 , 729 (1942) J. B. C. 190 , 611 (1951) B. J. 58 , 503 (1954) Meth. Enzymol. 6 , 645 (1963)	
Inosine-5'-phosphate		乙醇, 乙醚	B. B. R. C. 24 , 872 (1966)	
乳清酸核苷-5'-磷酸	368.2		J. A. C. S. 76 , 2844 (1954) Biochem. Preps. 9 , 5 (1962)	J. A. C. S. 76 , 2844 (1954)
Orotidine-5'-phosphate			J. A. C. S. 85 , 1118 (1963)	
胸腺嘧啶	126.1	0.4 ²¹ 水 S. 热水; Sl. S. 乙醇	Levene and Bass, p. 57 B. J. 70 , 642 (1958) Nature, Lond. 181 , 254 (1958)	J. B. C. 197 , 227 (1952) Analyt. Biochem. 1 , 249 (1960)
Thymine			B. B. A. 61 , 141 (1962)	
尿嘧啶核苷	244.2	S. 水	Levene and Bass, p. 165	
Uridine		Sp.s. 乙醇	J. B. C. 237 , 2283 (1962)	
尿苷-5'-二磷酸	404.2		J. B. C. 209 , 23, 41 (1954)	
UDP			J. A. C. S. 81 , 3032 (1959)	
Uridine-5'-diphosphate			B. B. A. 91 , 1 (1964)	
			Ber. 98 , 1045 (1965)	
尿苷-5'-磷酸	324.2		J. B. C. 203 , 319 (1953)	J. B. C. 209 , 41 (1954)
5'-UMP			Biochem. Preps. 9 , 5 (1962)	
Uridine-5'-Phosphate			B. B. A. 61 , 29 (1962)	
			B. B. R. C. 24 , 872 (1966)	
尿苷-5'-三磷酸	484.2		J. A. C. S. 75 , 5449 (1953)	J. B. C. 209 , 41 (1954)
UTP			J. B. C. 209 , 23, 41 (1954)	
Uridine-5'-triphosphate			Biochem. Preps. 9 , 120 (1962)	
脱氧尿苷-5'-磷酸	308.2		J. A. C. S. 87 , 2265 (1965)	
Uracil deoxyribose-5'-phosphate			B. B. R. C. 10 , 289 (1963)	
脱氧尿苷	228.2	S. 甲醇, 水	Nature, Lond. 166 , 557 (1950)	
Uracil deoxyriboside		-	J. C. S. 1952, 2721 J. C. S. 1958, 3035	
脱氧胸苷-5'-三磷酸	482.2		B. B. A. 39 , 82 (1960)	
Thymine deoxyribose-5'-triphosphate			Biochem. Preps. 9 , 120 (1962)	
脱氧胸苷	242.2		J. B. C. 233 , 263 (1958)	
Thymine deoxyriboside			B. J. 86 , 562 (1963)	
			J. C. S. 1950, 1990 J. C. S. 1952, 2721 B. J. 35 , 855 (1941)	Arch. B. B. 73 , 180 (1958)

续 表

名 称	分子量	溶解度	制 备 方 法	分析方法
胸腺嘧啶 Thymine	126.1	0.404 ²³ 水 S. 热水 Sl. s. 乙醇	J. A. C. S. 68, 912 (1946) Levene and Bass, p. 67	J. B. C. 197, 227 (1952) J. Bact. 84, 17 (1962)
5-甲基胞嘧啶 5-Methylcytosine	125.1	4.5 ²³ 水	B. J. 48, 581 (1951) Levene and Bass, p. 73 J. A. C. S. 81, 178 (1959)	B. J. 48, 581 (1951)
6-甲基氨基嘌呤 6-Methylamino-purine	149.2	0.12 ²⁰ , 2.0 ¹⁰⁰ 水	B. J. 68, 627 (1958) J. A. C. S. 74, 411 (1952)	Meth. biochem. Anal. 6, 79 (1958)
脱氧胞苷-5'-三磷酸 Cytosine deoxy-ribose-5'-triphosphate	467.2		B. B. A. 39, 82 (1960) Biochem. Preps. 9, 120 (1962) B. J. 86, 562 (1963)	
脱氧腺苷-5'-三磷酸 Adenine deoxy-ribose-5'-triphosphate	491.3		B. B. A. 39, 82 (1960) Biochem. Preps. 9, 120 (1962) B. J. 86, 562 (1963)	
腺苷-5'-二磷酸-D-葡萄糖 Adenosine-5'-diphosphate D-glucose (ADPG)	589.3	S. 水 i. 甲醇, 丙酮, 乙醚	Arch B. B. 106, 371 (1964) J. B. C. 237, 3577 (1962) B. B. A. 91, 1 (1964)	J. B. C. 237, 3577 (1962)
胞苷-5'-二磷酸 胆碱 Cytidine 5'-diphosphate choline	506.3	S. 水	J. A. C. S. 77, 250 (1955) J. B. C. 222, 185 (1956)	B. B. A. 40, 425 (1960) J. B. C. 235, 37 (1960) B. J. 78, 209 (1961)
胞苷-5'-二磷酸 D-葡萄糖 CDPG	565.3		B. B. R. C. 7, 1 (1962)	
鸟苷-5'-二磷酸 D-葡萄糖 Guanosine 5'-diphosphate D-glucose	605.3		B. J. 75, 428 (1960) J. B. C. 237, 1260 (1962) B. B. A. 91, 1 (1964) J. C. S. 1961, 2574	
胸腺-5'-二磷酸 Thymidine 5'-diphosphate D-glucose	564.4	S. 水 i. 甲醇, 丙酮, 乙醚	J. B. C. 263, 1791 (1961) J. B. C. 237, 3014 (1962)	J. B. C. 237, 3041 (1962)
尿苷-5'-二磷酸 N-乙酰葡萄糖胺 Uridine 5'-diphosphate N-acetylglucosamine UDPGal	607.4		B. B. A. 46, 595 (1961) Meth. Enzymol. 6, 777 (1963); 8, 147 (1966) Meth. biochem. Anal. 10, 107 (1962)	J. B. C. 203, 1055 (1953)

续 表

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
尿苷-5'-二磷酸 D-半乳糖 Uridine 5'-diphosphate D-galactose	566.4	S. 水; 甲醇; i. 丙酮	Arch. B. B. 33, 186 (1951) J. B. C. 223, 977 (1956) J. A. C. S. 83, 659 (1961) Meth. biochem. Anal. 10, 107 (1962)	
尿苷-5'-二磷酸 D-半乳糖醛酸 Uridine 5'-diphosphate	580.3		B. B. A. 53, 589 (1961) Arch. B. B. 78, 401 (1958) J. B. C. 235, 910 (1960)	
D-galacturonic acid				
尿苷-5'-二磷酸 D-葡萄糖 Uridine 5-diphosphate D-glucose	566.4	S. 水, 甲醇 i. 丙酮, 乙醚	B. J. 51, 426 (1952) J. B. C. 223, 977 (1956) B. B. A. 26, 146 (1957) Meth. Enzymol. 6, 777 (1963) J. A. C. S. 83, 659 (1961)	Meth. biochem. Anal. 10, 107 (1962) Meth. Enzymol. 2, 676 (1955); 3, 968, 974 (1957)
尿苷-5'-二磷酸 D-葡萄糖醛酸 Uridine 5'-diphosphate D-glucuronic acid	580.3	S. 水 i. 甲醇, 丙酮	B. J. 59, 279 (1955) J. A. C. S. 79, 2342 (1957) J. B. C. 228, 357 (1957) J. Biochem., Tokyo 51, 277 (1962) Biochemistry 1, 1171 (1962)	
尿苷-5'-二磷酸 L-鼠李糖 Uridine 5'-diphosphate L-rhamnose	550.3		B. B. A. 33, 276 (1959) B. B. R. C. 8, 204 (1962) Arch. B. B. 103, 276 (1963)	
尿苷-5'-二磷酸 D-木糖 Uridine 5'-diphosphate D-xylose	536.3		J. B. C. 223, 977 (1956) Meth. Enzymol. 6, 782 (1963)	

5. 磷酸酯类物质

名称	分子量	制备方法	分析方法
磷酸精氨酸 Arginine phosphate	254.2	B. J. 62, 358 (1956) B. J. 92, 429 (1964)	B. J. 63, 153 (1956)
脱氧核糖-5-磷酸 Deoxyribose-5-phosphate	214.1	J. B. C. 215, 389 (1955) J. B. C. 198, 885 (1952) Biochem. Preps. 9, 35 (1962) J. B. C. 235, 1292 (1960)	Biochem. Preps. 9, 35 (1962)
D-果糖-1, 6-二磷酸 D-Fructose-1, 6-diphosphate	340.1	J. A. C. S. 64, 2722 (1942) Arch. B. B. 3, 33 (1944) Biochem. Preps. 2, 52 (1952) Meth. Enzymol. 3, 240 (1957) B. Z. 161, 240 (1925)	J. B. C. 208, 55 (1954) B. J. 53, 157 (1953) Arch. B. B. 74, 326 (1958)

续 表

名 称	分子量	制 备 方 法	分 析 方 法
D-果糖-1-磷酸	260.1	J. B. C. 201 , 645 (1953) Meth. Enzymol. 3 , 169 (1957) Biochem. Preps. 7 , 58 (1960)	Meth. Enzymol. 3 , 171 (1957)
D-Fructose-1-phosphate		Arch. B. 3 , 33 (1944)	Arch. B. B. 74 , 306 (1958)
D-果糖-6-磷酸	260.1	Meth. Enzymol. 3 , 167 (1957)	
D-Fructose-6-phosphate			
α -D-葡萄糖-1-磷酸	260.1	J. A. C. S. 66 , 560 (1944) Biochem. Preps. 4 , 63 (1955) B. J. 59 , 203 (1955)	B. J. 53 , 157 (1953) J. B. C. 208 , 55 (1954)
α -D-Glucose-1-phosphate			
D-葡萄糖-6-磷酸	260.1	Biochem. Preps. 2 , 39 (1952) Biochem. Preps. 3 , 71 (1953) B. J. 59 , 13 (1955)	J. B. C. 208 , 55 (1954) Arch. B. B. 74 , 306 (1958)
D-Glucose-6-phosphate			
D-1, 3-二磷酸甘油酸	266.0	B. Z. 301 , 135 (1939)	B. Z. 303 , 132 (1939)
D-Glyceric acid 1,3-diphosphate			
D-(-)-3-磷酸甘油酸	186.1	Arch. B. 3 , 105 (1944) J. B. C. 226 , 777 (1957)	B. Z. 297 , 60 (1938)
D-(-)Glyceric acid-3-phosphate			
L- α -甘油磷酰胆碱	275.2	B. J. 62 , 689 (1956) J. B. C. 161 , 523 (1945) Biochem. Preps. 6 , 16 (1958) J. B. C. 220 , 1 (1956)	J. B. C. 197 , 601 (1952) J. B. C. 212 , 887 (1955) B. J. 62 , 693 (1956)
L- α -Glyceryl-phosphoryl-choline			
L- α -甘油磷酰乙醇胺	215.2	J. A. C. S. 75 , 4510 (1953) B. J. 50 , 449 (1952)	J. B. C. 212 , 887 (1955)
L- α -Glycerylphosphoryl-ethanolamine			
甘油磷酰肌醇	334.2	B. J. 71 , 195 (1959) J. A. C. S. 81 , 2591 (1959) J. B. C. 236 , 1907 (1961)	B. J. 71 , 195 (1959)
Glycerylphosphorylinositol			
甘油磷酰丝氨酸	259.2	J. A. C. S. 81 , 2167 (1959) B. J. 71 , 195 (1959)	J. B. C. 212 , 887 (1955)
Glycercylphosphorylserine			
磷酸烯醇丙酮酸	168.0	B. Z. 273 , 60 (1934) J. B. C. 180 , 145 (1949) J. B. C. 190 , 21 (1951) B. B. A. 78 , 732 (1963) Biochem. Preps. 11 , 101 (1966)	B. Z. 273 , 60 (1934)
Phosphoenolpyruvic acid			
核糖-1-磷酸	230.1	J. B. C. 167 , 477 (1947) J. B. C. 193 , 497 (1951) J. A. C. S. 79 , 441 (1957)	J. B. C. 162 , 421 (1946)
Ribose-1-phosphate			
D-核糖-5-磷酸	230.1	Arch. B. B. 34 , 209 (1951) J. A. C. S. 75 , 1153 (1953) J. A. C. S. 76 , 5523 (1954) B. J. 58 , 503 (1954)	J. B. C. 167 , 369 (1947) Arch. B. B. 74 , 306 (1958)
D-Ribose-5-phosphate			
D-核酮糖-5-磷酸	230.1	Meth. Enzymol. 9 , 41, 46 (1966) Arch. B. B. 74 , 295 (1958) J. B. C. 236 , 2975 (1961)	Arch. B. B. 74 , 306 (1958) J. B. C. 196 , 135 (1952)
D-Ribulose-5-phosphate			

续 表

名称	分子量	制备方法	分析方法
D-木酮糖-5-磷酸 D-Xylulose-5-phosphate	230.1	J. B. C. 223, 993 (1956) Meth. Enzymol. 9, 41 (1966)	Arch. B. B. 74, 306 (1958)

6. 固醇类物质的制备

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
可的松 Cortisone	360.4	S. 甲醇乙 醇,丙酮 Sl.s. 乙醚, 苯,氯仿	J. B. C. 114, 613 (1936) J. A. C. S. 74, 4223 (1952)	J. clin. Endocr. Metab. 12, 519 (1952) B. J. 54, 523 (1953)
氢化可的松 Hydrocortisone	362.4	Sl.s. 水 S. 冰醋酸, 氯仿,甲醇	J. B. C. 124, 459 (1938) J. B. C. 175, 451 (1948)	J. clin. Endocr. Metab. 21, 1146 (1961)
17 β -雌(甾)二醇 Oestradiol-17 β	272.4	i. 水 S. 乙醇, 丙酮及碱液	J. B. C. 115, 435 (1936) J. B. C. 134, 391 (1940) B. J. 34, 1293 (1940) Ber. 74, 1914 (1941)	J. Endocr. 16, 49 (1957)
雌(甾)三醇 Oestriol	288.4	Sp.s. 水 S. 乙醇, 氯仿,乙醚	B. J. 24, 435, 1021 (1930) Nature, Lond. 131, 766 (1933)	J. Endocr. 16, 49 (1957)
雌(甾)酮 Oestrone	270.4	S. 稀碱 i. 水 4.0 乙醇	J. B. C. 91, 641, 655 (1931) Am. J. Physiol. 90, 329 (1929) B. J. 34, 1293 (1940)	J. Endocr. 16, 49 (1957)
脱氢可的松 Prednisone	358.5	Sp. s. 水 0.67 乙醇	Science 121, 176 (1955) J. A. C. S. 77, 4781 (1955)	
孕(甾)二醇 Pregnanediol	320.5	Sp.s. 有机溶剂	J. B. C. 143, 716 (1942)	
孕(甾)烯醇酮 Pregnolone	316.5	Sp.s. 水 17 氯仿 2 乙醇	J. A. C. S. 60, 2931 (1938) Ber. 67, 1611 (1934) J. A. C. S. 71, 1840 (1949)	
睾(甾)酮 Testosterone	288.4	i. 水 S. 乙醇,乙醚 有机溶剂	Z. B. C. 233, 281 (1935) Z. P. C. 237, 89 (1935) Ber. 71, 2278 (1938)	
氟羟脱氢皮质甾醇 Triamcinolone	394.4	S. 丙酮、 乙醇,氯仿	J. A. C. S. 78, 5693 (1956) 81, 1689 (1959)	
脱氢皮(甾)醇 Prednisolone	360.5	Sl.s. 水 3.3 乙醇 0.55 氯仿	Science 121, 176 (1955) J. A. C. S. 77, 4781 (1955)	
雄固醇烯二酮 Androstanedione	288.4	S. 乙醚,苯	Ber. 68, 2097 (1935) J. B. C. 172, 263 (1948)	
皮质(甾)酮 Corticosterone	346.4	S. 乙醇 有机溶剂 i. 水	J. B. C. 114, 613 (1936)	J. clin. Endocr. Metab. 21, 1146 (1961)

7. 酸, 肽, 氨基酸, 多肽及其衍生物的制备

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
乙酰胆碱 Acetylcholine bromide	226.1 (Br)	V. S. 水, 乙醇 i. 乙醚, 苯	J. A. C. S. 73, 2968 (1951) J. gen. Chem., U. S. S. R. 28, 3040 (1958)	Meth. med. Res. 9, 125 (1961)
D-肾上腺素 D-Adrenaline	183.2	S. 冰醋酸, 矿酸, 碱 Sl.s. 水, 乙醇 i. 乙醚, 丙 酮, 氯仿	Am. J. Physiol. 5, 457 (1901) Ber. 59, 1068 (1926) C. A. 28, 4398 (1934)	Meth. med. Res. 9, 125 (1961)
r-氨基丁酸 r-Amino-butyric acid	103.1	V. S. 水 i. 乙醚, 乙 醇, 苯	B. J. 48, 429 (1951) Arch. B. B. 46, 248 (1953) Org. Synth. Coll. 2, 25 (1943)	Analyt. Chem. 28, 1679 (1956)
L-赖肌肽 L-Anserine	240.3	V.S. 水 Sl.s. 甲醇, 乙醇	J. Biochem., Tokyo 54, 349, 355, 363 (1963) J. Org. Chem. 29, 1968 (1964)	J. B. C. 235, 1398 (1960) B. J. 81, 98 (1961)
L-精氨琥珀酸 L-Arginino-Succinic acid	290.3	V. S. 水 i. 乙醇	J. B. C. 204, 95 (1953) J. B. C. 203, 143 (1953) B. J. 77, 135 (1960)	J. B. C. 204, 115 (1953) Nature, Lond. 192, 555 (1961)
尸胺 Cadaverine	102.2	s. 水 Sl.s. 乙醇, 乙醚	J. C. S. 1946, 782 Ber. 90, 1251 (1957) C. A. 59, 1583d (1963)	Nature, Lond. 197, 290 (1963)
肉碱 Carnitine	161.2	V.S. 水, 乙醇 Sl.s. 丙 酮, 异丙醇 i. 乙醚	Biochem. Preps. 7, 26 (1960) Arch. B. B. 66, 10 (1957) Z. P. C. 318, 129 (1960)	Arch. B. B. 75, 24 (1958) Analyt. Chem. 32, 870, 874 (1960)
L-肌肽 L-Carnosine	226.2	32 水 i. 乙醇	Biochem. Preps. 4, 38 (1955) Ber. 94, 2768 (1961) J. Org. Chem. 29, 1968 (1964) J. Biochem., Tokyo 53, 271 (1963), 54, 349 (1963)	J. B. C. 235, 1398 (1960) B. J. 81, 98 (1961)
L-瓜氨酸 L-Citrulline	175.2	S. 水 i. 甲醇 乙醇	Biochem. Preps. 3, 100, 104 (1953)	J. B. C. 209, 145 (1954)
促肾上腺皮质素 ACTH Corticotrophin	4566	V.S. 水 Sl. s. 丁醇 i. 冷丙酮	J. B. C. 213, 171 (1955) Science 124, 934 (1954) J. A. C. S. 78, 5051 (1956) Nature, Lond. 199, 172 (1963)	Acta Endocr. 29, 70 (1958) Endocrinology 71, 13 (1962)
L-β-(3,4-二羟基苯)丙氨酸 L-β-(3,4-Dihydroxyphenyl)alanine (DOPA)	197.2	0.5% 水 S. 酸或碱 i. 乙醇, 乙 醚	Biochem. Preps. 1, 25 (1949)	Ser. 90, 1687 (1957)
3,5-二碘酪氨酸 3,5-Diodotyrosine	433.0	S. 碱液	B. J. 39, 157 (1945) Biochem. Preps. 10, 171 (1963) Meth. Enzymol. 4, 856 (1957)	Meth. Enzymol. 4, 856 (1957) Meth. biochem. Anal. 12, 143 (1964)

续 表

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
L-谷胱甘肽(氧化型)	612.6	S. 水 i. 乙醇, 乙醚	J. B. C. 90, 409 (1931) J. B. C. 194, 119 (1952) Biochem. Preps. 9, 52 (1962)	Bergmeyer. Methods of Enzymatic Analysis, p, 363, Academic press (1963)
L-Glutathione oxidized GSSG				
L-谷胱甘肽(还原型)	307.1	S. 水 i. 乙醇, 乙醚	Biochem. Preps. 2, 87 (1952) J. C. S. 1957, 880 Ber. 97, 2434 (1964) Meth. Enzymol. 3, 603 (1957)	Arch. B. B. 82, 70 (1959) Analyt. Biochem. 8, 217 (1964)
L-Glutathione reduced GSH				
5-羟色胺	176.2	2 ²⁷ , 10 ¹⁰⁰ 水	J. gen. Chem. U. S. S. R. 34, 1605 (1964)	Meth. Enzymol. 6, 598 (1963)
5-Hydroxytryptamine		S. 冰醋酸	J. C. S. 1961, 2919	Meth. biochem. Anal. 6, 95 (1958)
		Sl. s. 甲醇, 95%乙醇	J. Org. Chem. 24, 894	Analyt. biochem. 6, 393 (1963)
		i. 丙酮, 乙醚, 苯	(1959) J. C. S. 1958, 3493	
吲哚乙酸 Indolacetic	175.2	0.16 水; V.S. 乙醇;	Ber. 85, 323 (1952) J. A. C. S. 75, 3589 (1953)	Analyt. Biochem. 4, 423 (1962)
		S. 丙酮, 乙醚; Sl. s. 苯;	Ber. 91, 1141 (1958)	
		i. 氯仿	J. Org. Chem. 28, 589, 1246 (1963)	
3-碘酪氨酸 3-Iodotyrosine	307.1	6.7	B. J. 38, 320 (1944)	Meth. biochem. Anal. 12, 143 (1964)
		Sl. s.	Meth. Enzymol. 4, 856 (1957)	
			Nature, Lond. 197, 180 (1963)	
犬尿氨酸 Kynurenone	208.2	S. 水	Biochem. Preps 3, 108 (1953)	B. J. 53, 379 (1953)
			J. A. C. S. 76, 1708 (1954)	J. B. C. 219, 985 (1956)
			C. A. 47, 12489d (1953)	
去甲基肾上腺素 Noradrenaline	169.2	S. 矿酸, 碱	J. A. C. S. 75, 1757 (1953)	Arch. B. B. 85, 345 (1959)
		Sl.s. 水,	J. A. C. S. 77, 2896 (1955)	Meth. med. Res. 9, 125 (1961)
		甲醇, 乙醚		
L-鸟氨酸 L-Ornithine	132.2	V. S. 水	Biochem. Preps. 3, 97 (1953)	B. J. 39, 46 (1945)
		Sl.s. 乙醚	Ber. 91, 2418 (1958)	B. J. 41, vii (1947)
			C. A. 53, 19904i (1959)	
催产素 Oxytocin	1007	s. 水	J. A. C. S. 81, 2504 (1959)	Endocrinology, 71, 196 (1962)
		Sl.s. 丙酮	J. B. C. 233, 116 (1958)	
肌氨酸 Sarcosine	89.1	4.81 ¹⁰ 水	J. A. C. S. 76, 3213 (1954)	J. B. C. 200, 803 (1953)
		Sl.s. 乙醇	J. C. S. 1931, 1894	
· 甲状腺素 L-thyroxine	776.9	S. 碱	J. C. S. 1949, 3424	Meth. Enzymol. 4, 856 (1957)
		Sl.s. 水	Ber. 96, 1 (1963)	Meth. biochem. Anal. 12, 143 (1964)
		i. 乙醇, 乙 醚	Biochem. Preps. 10, 171, 176 (1963)	
			Meth. Enzymol. 4, 856 (1957)	
3,5,3'-三碘-L- 甲状腺素	651.0	S. 碱	B. J. 53, 645 (1953)	同 L-甲状腺素
3,5,3',-Triodo-L- thyroxine		Sl. s. 水	Ber. 96, 1 (1963)	
			Meth. Enzymol. 4, 856 (1957)	

续 表

名称	分子量	溶解度	制备方法	分析方法
色胺 Tryptamine	160.2	V.S. 乙醇, 丙酮 S.I.s. 水, 乙醚	Ber. 85 , 324 (1952) J. Org. Chem. 23 , 146 (1958) J. A. C. S. 82 , 2386 (1960)	Meth. med. Res. 9 , 169, 175 (1961) Analyt. Chem. 32 , 666 (1960)
后叶加压素 (抗利尿激素) Vasopressin	1084	S. 水 i. 丙酮	J. B. C. 222 , 951 (1956) J. B. C. 233 , 116 (1958) J. A. C. S. 82 , 3195 (1960)	Methods in Hormone Research, vol. 2, p. 495, Academic Press (1962)

8. 某些生物大分子的制备

名称	分子量	溶解度	制备及测定方法
清蛋白(卵) Albumin	45,000—46,000	S. 水	B. J. 30 , 227 (1936) The Proteins, eds. Neurath and Bailey, vol. 2A, p. 443, Academic Press, New York (1954)
支链淀粉 Amylopectin	200,000—400,000	S. 水, 甲 酰胺	Modern Methods of Plant Analysis, vol. 2, p. 166, Springer, Berlin (1955)
直链淀粉 Amylose	50,000—150,000	S. 稀碱, 甲酰胺	Modern Methods of Plant Analysis, vol. 2, p. 166, Springer, Berlin (1955)
抗生素素蛋白 Avidin	66,000—70,000	S. 水	Arch. B. B. 39 , 80 (1952) B. J. 89 , 591 (1963) B. J. 92 , 16c (1964)
酪蛋白 Casein	75,000—100,000	S. 稀碱, 矿酸 i. 乙醇, 乙醚	J. A. C. S. 66 , 1725 (1944) The Proteins, eds. Neurath and Bailey, vol. 2A, p. 397, Academic Press, New York (1954) Analyt. Biochem. 9 , 423 (1964) J. A. C. S. 84 , 4929 (1962)
纤维素(包括 DEAE, CM 和磷酸 化衍生物) Cellulose	600,000	i. 水, 乙醇, 乙醚, 氯仿 S. 浓硫酸, 发烟盐酸, 浓 磷酸, 氢氧化 铜的氨溶液,	Methods in Carbohydrate Chemistry, vol. 3 (1963) Modern Methods of Plant Analysis, vol. 2, p. 197, Springer, Berlin (1955) DEAE, CM 及磷酸化衍生物见: Biochem. Preps. 8 , 39, 45, 47 (1961) Adv. Carbohyd. Chem. 15 , 371 (1960) 测定方法见透明质酸
几丁质, 壳多糖 Chitin		S. 浓酸	J. B. C. 211 , 605 (1954)
硫酸软骨素 Chondroitin	25,000—30,000	i. 水 S. 水	
硫酸软骨素 A 和 C Chondroitin sulphates A and C	30,000—50,000	S. 水	硫酸软骨素 A 与 C 在其他酸性多糖分离提取时, 二者 常混在一起, 因需进一步用色谱法纯化。 B. B. A. 21 , 506 (1956)
硫酸软骨素 B Chondroitin B	20,000—30,000	S. 水	硫酸软骨素 A, Meth. Enzymol. 3 , 20 (1957) 硫酸软骨素 C, J. B. C. 215 , 685 (1955) J. B. C. 233 , 541 (1958) B. B. A. 21 , 506 (1956) 硫酸软骨素 A, B. C. 的测定见透明质酸的方法

续 表

名 称	分子量	溶解度	制 备 及 测 定 方 法
葡聚糖 右旋糖酐 Dextran		S. 水, 甲酰胺	<i>Adv. Carbohyd. Chem.</i> 15 , 341 (1960)
脱氧核糖核酸 Deoxyribonucleic acid DNA	6—120 百万	Sl.s. 水; S.1—3M 盐 成胶液,稀碱; i. 有机溶剂	<i>J. molec. Biol.</i> 3 , 208 (1961) <i>Nature, Lond.</i> 191 , 1375 (1961) <i>Prog. Nucl. Acid Res.</i> 3 , 1 (1964) 测定方法见: <i>B. J.</i> 62 , 315 (1956) <i>J. B. C.</i> 213 , 107 (1955) <i>Meth. Biochem. Anal.</i> 1 , 287 (1954); 6 , 1 (1958) 14 , 113 (1966)
糖 原 (动物淀粉) Glycogen	1—10 百万	V.S. 水; S. 热乙醇; i. 冷乙醇	<i>Adv. Carbohyd. Chem.</i> 12 , 262 (1957) <i>J. A. C. S.</i> 64 , 2349 (1942) <i>J. B. C.</i> 199 , 97 (1952) 测定方法见: <i>J. B. C.</i> 220 , 583 (1956) <i>J. B. C.</i> 127 , 123 (1939) <i>Arch. B.</i> 21 , 224 (1949) <i>J. B. C.</i> 185 , 231 (1950) <i>J. Lab. clin. Med.</i> 46 , 255 (1955)
血红蛋白 Haemoglobin	67,000	S. 水	测定方法见: <i>Nature, Lond.</i> 175 , 903 (1955) <i>J. B. C.</i> 235 , 3283 (1960) <i>B. B.A.</i> 29 , 443 (1958)
硫酸乙酰肝素 Heparan sulphate	17,000—20,000	S. 水	测定方法见透明质酸
组 蛋 白 Histones	8400—57,000	S. 水, 稀酸; i. 氨水	<i>Phillips, Prog. Biophys. Chem.</i> 12 , 21 (1961)
透 明 质 酸 Hyaluronic acid	0.1—10 百万	S. 水	<i>B. B. A.</i> 69 , 574 (1963) <i>J. B. C.</i> 239 , 726 (1964) <i>B. J.</i> 92 , 34p (1964) 测定方法见: <i>Meth. biochem. Anal.</i> 2 , 313 (1955) <i>Meth. Enzymol.</i> 3 , 73 (1957) <i>Meth. biochem. Anal.</i> 8 , 145 (1960)
菊 粉 Inulin	3000—5000	Sp.s. 水, 乙 醇	<i>Modern Methods of Plant Analysis. vol.</i> 2 , p. 189, Springer, Berlin (1955) <i>J. B. C.</i> 51 , 275 (1922) <i>P. S. E. B. M.</i> 74 , 117 (1950)
硫酸角质素 Keratan sulphate	10,000—20,000	S. 水	<i>J. B. C.</i> 205 , 611 (1953) <i>Acta chem. scand.</i> 11 , 668 (1957)
β -乳球蛋白 β-Lactoglobulin	35,000—42,000	S. 水	<i>B. J.</i> 58 , 332 (1954) <i>Biochem. Preps.</i> 4 , 23 (1955) <i>Acta Chem. scand.</i> 16 , 2067 (1962)
昆布多糖 Laminarin		S. 水	<i>Modern Methods of Plant Analysis, vol.</i> 2 , p. 178, Springer, Berlin (1955)
果聚糖(左聚糖) Levan		S. 水	<i>J. B. C.</i> 140 , 105 (1941)

续 表

名称	分子量	溶解度	制备及测定方法
肌红蛋白 Myoglobin	18,500—18,800	S. 水	Arch. B. B. 91 , 319 (1960) J. B. C. 236 , 2238 (1961) Arch. B. B. 91 , 310 (1960) Nature, Lond. 198 , 1201 (1963)
果胶酸 Pectic acid	60,000—80,000	S. 稀酸	B. J. 47 , 437 (1950)
鱼精蛋白 Protamine	8000 鲑精蛋白	S. 水, 稀酸, 氨水	J. Gen. Physiol. 30 , 101 (1946) B. B. A. 91 , 416 (1964) Adv. Protein Chem. 15 , 1 (1960)
核糖核酸 Ribonucleic acid (RNA)	10,000— 2,000,000	Sl. s. 水; i. 有机溶剂	B. J. 96 , 266 (1965) B. J. 93 , 5c (1964) B. N. R. C. 13 , 61 (1963) Progr. nucl. Acid Res. 3 , 1 (1964) J. B. C. 198 , 297 (1952); 221 , 635 (1956) Meth. biochem. Anal. 1 , 287 (1954); 6 , 1 (1958); 14 , 113 (1966) Biochem. Preps. 9 , 132 (1962)
烟草花叶病毒 Tobacco mosaic virus	40×10^6	S. 水, 生理盐水	
转运核糖核酸 Transfer-RNA (tRNA)	24,000—30,000	S. 水	Prog. Nucl. Acid Res. 2 , 259 (1963) J. B. C. 236 , 200 (1961) J. B. C. 236 , 1726, 1741 (1961) J. Molec. Biol. 4 , 347 (1962) B. B. A. 80 , 574 (1964) Meth. Enzymol. 12B , 166, 169, 173 (1968)

附录二 部分国际单位换算及缓冲液配制方法

A. 部分国际单位及换算方法

1. 长度单位

米 (m) = 10 分米 (dm) = 100 厘米 (cm) = 10^3 毫米 (mm) = 10^6 微米 (μm) = 10^9 纳米 (nm)
 $= 10^{10}$ 埃 (\AA)

1 英寸 = 2.539998 厘米

2. 体积单位

升 (l) = 10 分升 (dl) = 100 厘升 (cl) = 10^3 毫升 (ml) = 10^6 微升 (μl)

3. 重量单位

公斤 (kg) = 10^3 克 (g) = 10^4 分克 (dg) = 10^3 厘克 (cg)
 $= 10^6$ 毫克 (mg) = 10^9 微克 (μg)

1 克 (g) = 10^3 毫克 (mg) = 10^6 微克 (μg)

1 市斤 = 500 克

1 磅 = 453.59237 克

4. 浓度单位

1 克分子浓度 = $1M = 1\text{mol/L} = 10^3\text{mol/m}^3$ (mole 译为中文：摩尔)

5. SI 单位制所用的词头

因数	词头	符号	因数	词头	符号
10	十	deca (da)	10^{-2}	厘	centi (c)
10^2	百	hecto (h)	10^{-3}	毫	milli (m)
10^3	千	kilo (k)	10^{-4}	微	micro (μ)
10^6	兆	mega (M)	10^{-9}	纳(诺)	nano (n)
10^9	吉(伽)	giga (G)	10^{-12}	皮(可)	pico (p)
10^{12}	太(拉)	tera (T)	10^{-18}	飞(母托)	femto (f)
10^{-1}	分	deci (d)	10^{-18}	阿(托)	atto (a)

6. SI 单位制导出单位的名称及符号

量的名称	SI 单位名称	SI 单位符号	SI 单位定义	SI 单位相当量
能量	焦(耳)	J	$\text{m}^2\text{kg s}^{-2}$	N · m
力	牛(顿)	N	mkgs^{-2}	$\text{kg} \cdot \text{m/s}^2$
压力	帕(斯卡)	Pa	$\text{m}^{-1}\text{kg s}^{-2}$	Nm^{-2}
功率	瓦(特)	W	$\text{m}^2\text{kg s}^{-3}$	Js^{-1}
电荷	库(仑)	C	As	JV^{-1}
电位; 电压	伏(特)	V	$\text{m}^2\text{kg s}^{-3}\text{A}^{-1}$	WA^{-1}
电阻	欧(姆)	Ω	$\text{m}^2\text{kg s}^{-3}\text{A}^{-2}$	VA^{-1}
电导	西(门子)	S	$\text{m}^{-2}\text{kg}^{-1}\text{s}^3\text{A}^2$	AV^{-1}
电容	法(拉)	F	$\text{m}^{-2}\text{kg}^{-1}\text{s}^4\text{A}^2$	CV^{-1}
光通量	流(明)	lm	cd · sr	

续 表

量的名称	SI 单位名称	SI 单位符号	SI 单位定义	SI 单位相当量
光亮度	勒(克斯)	lx	$m^{-2}cdsr$	$lm\text{m}^{-2}$
频率	赫(兹)	Hz	s^{-1}	

7. SI 单位制(米一千克一秒)基本物理量数及符号

物理量数	SI 单位制名称	符号
基本单位		
长度	米	m
质量	千克(公斤)	kg
时间	秒	s
电流	安(培)	A
热力学温度	开(尔文)	K
发光强度	坎(德拉)	cd
物质的量	摩(尔)	mol
补充单位		
平面角	弧 度	rad
立体角	球面度	sr

8. 一些常用的“C.G.S”制单位与 SI 单位制换算举例

(1) 压力: 每平方英寸上 1 磅 = 6894.76 Pa 每 1 毫米汞柱(托) = 133.322 Pa 1 大气压 = 101325 Pa 1 毫巴 = 100 Pa 1 巴 = 10^5 Pa (2) 能: 1 尔格 = 10^{-7} J 1 升-大气压 = 101.328 J 1 卡(热化学) = 4.184 J 1 卡(国际表) (Cal) = 4.1868 J 1 卡 15°C (Cal15) = 4.1855 J 电子伏(特) (eV) = $1.6021 \times 10^{-19} \text{ J}$ (3) 温度: $0^\circ\text{C} = 273.15 \text{ K}$ $0^\circ\text{F} = 459.67 \text{ K}$ (4) 放射性: 1 居里 (ci) = $3.7 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ (贝可)(5) 照明: 1 英尺-烛光 = 10.7693 lx (勒克斯)1 平方英尺-流明 = 10.7639 lx 1 平方米-流明(光通量) = 1 lx

B. 生化分离制备一些常用缓冲液的配制方法

1. 挥发性缓冲液 (pH1.9—8.9)

pH 范围	组 份
1.9	87 毫升冰醋酸, 25 毫升 88% 甲酸用水稀释至 1 升
2.1	25 毫升 88% 甲酸, 用水稀释至 1 升
3.1	5 毫升吡啶, 100 毫升冰醋酸, 用水稀释至 1 升

续 表

pH 范围	组份
3.5	5 毫升吡啶, 50 毫升冰醋酸, 用水稀释至 1 升
4.7	25 毫升吡啶, 25 毫升冰醋酸, 用水稀释至 1 升
6.5	100 毫升吡啶, 4 毫升冰醋酸, 用水稀释至 1 升
7.9	0.03M NH ₄ HCO ₃ ,
8.9	(NH ₄) ₂ CO ₃ (20 克/升) 溶液

[“Data for Biochemical Research” 2nd Edition P.505—506 (1969)]

2. 挥发性缓冲液(高压电泳用)

pH 范围	系 统
接近 2	醋酸—甲酸
2.3—3.5	吡啶—甲酸
3.5—6.0	吡啶—醋酸
3.0—6.0	*三甲胺—甲酸(或醋酸)
5.5—7.0	三甲基吡啶—醋酸
7.0—12.0	*三甲胺—二氯化碳
6.0—10.0	氯水—甲酸(或醋酸)
6.5—11.0	单(或三)乙醇胺—盐酸
8.0—9.5	碳酸氢铵—氯水

* 三甲胺缓冲液的使用参考 Porath, Nature, Lond. 175, 478 (1955)

3. 氧化钾-盐酸缓冲液 (pH 1.0—2.2)

25 毫升 0.2 M KCl (14.919 克/升), 加 x 毫升 0.2M HCl, 用蒸馏水稀释至 100 毫升

pH, 25°C	x 毫升 0.2M HCl
1.00	67.0
1.10	52.8
1.20	42.5
1.30	33.6
1.40	26.6
1.50	20.7
1.60	16.2
1.70	13.0
1.80	10.2
1.90	8.1
2.00	6.5
2.10	5.1
2.20	3.9

[Bower and Bates, J. Res. natn. Stand. 55, 197 (1955)]

4. 甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH 2.2—3.6)

甘氨酸分子量: 75.07

25 毫升 0.2M 甘氨酸 (15.01 克/升), 加 x 毫升 0.2M HCl, 用蒸馏水稀释至 100 毫升。

pH, 25°C	x毫升 0.2NHCl
2.2	22.0
2.4	16.2
2.6	12.1
2.8	8.4
3.0	5.7
3.2	4.1
3.4	3.2
3.6	2.5

[Sørensen, B. Z. 21, 131 (1909); Gomori, *Meth. Enzymol.* 1, 141 (1955)]

5. 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 2.6—7.6)

0.1M 柠檬酸: 含柠檬酸·H₂O (分子量 210.14) 21.01 克/升。

0.2M 磷酸氢二钠: 含 Na₂HPO₄ (分子量 141.98) 28.40 克/升; 或含 Na₂HPO₄·2H₂O (分子量 178.05) 35.61 克/升。

x毫升 0.1M 柠檬酸和 y毫升 0.2M 磷酸氢二钠混合。

pH	x毫升 0.1M 柠檬酸	y毫升 0.2M 磷酸氢二钠
2.6	89.10	10.90
2.8	84.15	15.85
3.0	79.45	20.55
3.2	75.30	24.70
3.4	71.50	28.50
3.6	67.80	32.20
3.8	64.50	35.50
4.0	61.45	38.55
4.2	58.60	41.40
4.4	55.90	44.10
4.6	53.25	46.75
4.8	50.70	49.30
5.0	48.50	51.50
5.2	46.40	53.60
5.4	44.25	55.75
5.6	42.00	58.00
5.8	39.55	60.45
6.0	36.85	63.15
6.2	33.90	66.10
6.4	30.75	69.25
6.6	27.25	72.75
6.8	22.75	77.25
7.0	17.65	82.35
7.2	13.05	86.95
7.4	9.15	90.85
7.6	6.35	93.65

[McIlvaine, J. B. C. 49, 183 (1921)]

6. 广泛缓冲液 (pH2.6—12.0)

每升混合液内含: 柠檬酸 6.008 克, 磷酸二氢钾 3.893 克, 硼酸 1.769 克, 巴比妥 5.266 克。

每 100 毫升混合液滴加 x 毫升 0.2N NaOH 至所需要 pH 值 (18°C)

pH	x 毫升 0.2N NaOH	pH	x 毫升 0.2N NaOH	pH	x 毫升 0.2N NaOH
2.6	2.0	5.8	36.5	9.0	72.7
2.8	4.3	6.0	38.9	9.2	74.0
3.0	6.4	6.2	41.2	9.4	75.9
3.2	8.3	6.4	43.5	9.6	77.6
3.4	10.1	6.6	46.0	9.8	79.3
3.6	11.8	6.8	48.3	10.0	80.8
3.8	13.7	7.0	50.6	10.2	82.0
4.0	15.5	7.2	52.9	10.4	82.9
4.2	17.6	7.4	55.8	10.6	83.9
4.4	19.9	7.6	58.6	10.8	84.9
4.6	22.4	7.8	61.7	11.0	86.0
4.8	24.8	8.0	63.7	11.2	87.7
5.0	27.1	8.2	65.6	11.4	89.7
5.2	29.5	8.4	67.5	11.6	92.0
5.4	31.8	8.6	69.3	11.8	95.0
5.6	34.2	8.8	71.0	12.0	99.6

[Johnson and Lindsey, *Analyst* 64, 490 (1939)]

7. 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH3.0—6.2)

0.1M 柠檬酸: 含柠檬酸·H₂O (分子量 210.14) 21.01 克/升。

0.1M 柠檬酸钠: 含柠檬酸三钠·2H₂O (分子量 294.12) 29.41 克/升。

pH	x 毫升 0.1M 柠檬酸	y 毫升 0.1M 柠檬酸三钠
3.0	82.0	18.0
3.2	77.5	22.5
3.4	73.0	27.0
3.6	68.5	31.5
3.8	63.5	36.5
4.0	59.0	41.0
4.2	54.0	46.0
4.4	49.5	50.5
4.6	44.5	55.5
4.8	40.0	60.0
5.0	35.0	65.0
5.2	30.5	69.5
5.4	25.5	74.5
5.6	21.0	79.0
5.8	16.0	84.0
6.0	11.5	88.5
6.2	8.0	92.0

[N. Hemington and R. M. C. Dawson]

8. 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH3.7—5.8)

0.2M 乙酸钠: 含 NaAc·3H₂O (分子量 136.09) 27.22 克/升

0.2M 乙酸: 含冰乙酸 11.7 毫升/升

pH, 18°C	x毫升 0.2M 乙酸钠	y毫升 0.2M 乙酸
3.7	10.0	90.0
3.8	12.0	88.0
4.0	18.0	82.0
4.2	26.5	73.5
4.4	37.0	63.0
4.6	49.0	51.0
4.8	59.0	41.0
5.0	70.0	30.0
5.2	79.0	21.0
5.4	86.0	14.0
5.6	91.0	9.0
5.8	94.0	6.0

[Walpole, J. C. S. 105, 2501 (1914)]

9. 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (pH5.8—8.0)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 178.05, 0.2M 溶液含 35.61 克/升

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 358.22, 0.2M 溶液含 71.64 克/升

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 分子量 138.01, 0.2M 溶液含 27.6 克/升

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分子量 156.03, 0.2M 溶液含 31.21 克/升

x毫升 0.2M 磷酸氢二钠加 y毫升 0.2M 磷酸二氢钠, 用蒸馏水稀释至 100 毫升。

pH, 25°C	x毫升 0.2M 磷酸氢二钠	y毫升 0.2M 磷酸二氢钠
5.8	4.0	46.0
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.5	25.5
7.0	30.5	19.5
7.2	36.0	14.0
7.4	40.5	9.5
7.6	43.5	6.5
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

[Gomori, Meth. Enzymol. 1, 143 (1955)]

10. $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲液 (0.05M, pH5.8—8.0)

x毫升 0.2M KH_2PO_4 + y毫升 0.2N NaOH 加水稀释至 20 毫升

pH(20°C)	x (毫升)	y (毫升)	pH(20°C)	x (毫升)	y (毫升)
5.8	5	0.372	7.0	5	2.963
6.0	5	0.570	7.2	5	3.500
6.2	5	0.860	7.4	5	3.950
6.4	5	1.260	7.6	5	4.280

续 表

pH(20°C)	x (毫升)	y (毫升)	pH(20°C)	x (毫升)	y (毫升)
6.6	5	1.780	7.8	5	4.520
6.8	5	2.365	8.0	5	4.680

[潘家秀等,蛋白质化学研究技术,科学出版社(1962)]

11. 巴比妥缓冲液 (pH6.8—9.6)

pH(18°C)	0.04M 巴比妥钠盐 (毫升)	0.2NHCl (毫升)	pH(18°C)	0.04M 巴比妥钠盐 (毫升)	0.2NHCl (毫升)
6.8	100	18.4	8.4	100	5.21
7.0	100	17.8	8.6	100	3.82
7.2	100	16.7	8.8	100	2.52
7.4	100	15.3	9.0	100	1.65
7.6	100	13.4	9.2	100	1.13
7.8	100	11.47	9.4	100	0.70
8.0	100	9.39	9.6	100	0.35
8.2	100	7.21			

巴比妥钠盐分子量=206.2, 0.04M 溶液含 8.25 克/升

[Britton and Robinson, J. Chem. Society 1931, 1456]

12. 硼酸缓冲液 (0.2M 硼酸盐, pH7.4—9.0)

pH	0.05M 硼砂 (毫升)	0.2M 硼酸 (毫升)	pH	0.05M 硼砂 (毫升)	0.2M 硼酸 (毫升)
7.4	1.0	9.0	8.2	3.5	6.5
7.6	1.5	8.5	8.4	4.5	5.5
7.8	2.0	8.0	8.7	6.0	4.0
8.0	3.0	7.0	9.0	8.0	2.0

硼砂 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 分子量=381.43, 0.05M 溶液 (=0.2M 硼砂) 含 19.07 克/升, 硼酸分子量=61.84, 0.2M 溶液含 12.37 克/升

硼砂易失去结晶水, 必须放带塞的瓶中保存, 硼砂溶液也可以用半中和的硼酸溶液代替

[Holmes, Anat. Record, 86, 157 (1943)]

13. 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (0.05M, pH8.6—10.6)

x 毫升 0.2M 甘氨酸 + y 毫升 0.2N NaOH 加水稀释至 200 毫升

pH	x	y	pH	x	y
8.6	50	4.0	9.6	50	22.4
8.8	50	6.0	9.8	50	27.2
9.0	50	8.8	10.0	50	32.6
9.2	50	12.0	10.4	50	38.6
9.4	50	16.8	10.6	50	45.5

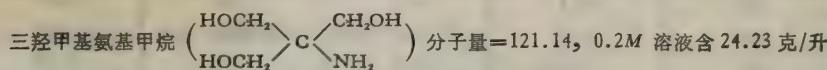
甘氨酸分子量=75.07, 0.2M 溶液含 15.01 克/升

[Gomori, Meth. Enzymol. 1, 145 (1955)]

14. Tris-缓冲液 (0.05M, pH7-9)

x 毫升 0.2M 三羟甲基氨基甲烷 + y 毫升 0.1NHCl 加水稀释至 100 毫升

pH		0.2M Tris	0.1NHCl	pH		0.2M Tris	0.1NHCl
23°C	37°C			23°C	37°C		
9.10	8.95	25	5	8.05	7.90	25	27.5
8.92	8.78	25	7.5	7.96	7.82	25	30.0
8.74	8.60	25	10.0	7.87	7.73	25	32.5
8.62	8.48	25	12.5	7.77	7.63	25	35.0
8.50	8.37	25	15.0	7.66	7.52	25	37.5
8.40	8.27	25	17.5	7.54	7.40	25	40.0
8.32	8.18	25	20.5	7.36	7.22	25	42.5
8.23	8.10	25	22.5	7.20	7.05	25	45.0
8.14	8.00	25	25.0				



[潘家秀等, 蛋白质化学研究技术, 科学出版社(1962)]

15. 硼砂-NaOH 缓冲液 (0.05M 硼酸根)

x 毫升 0.05M 硼砂 + y 毫升 0.2NNaOH 加水稀释至 200 毫升

pH	x	y	pH	x	y
9.3	50	0.0	9.8	50	34.0
9.4	50	11.0	10.0	50	43.0
9.6	50	23.0	10.1	50	46.0

[潘家秀等, 蛋白质化学研究技术, 科学出版社(1962)]

16. 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (0.1M) Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 存在时不得使用

pH		0.1M Na ₂ CO ₃ (毫升)	0.1M NaHCO ₃ (毫升)	pH		0.1M Na ₂ CO ₃ (毫升)	0.1M NaHCO ₃ (毫升)
20°C	37°C			20°C	37°C		
9.16	8.77	1	9	10.14	9.90	6	4
9.40	9.12	2	8	10.28	10.08	7	3
9.51	9.40	3	7	10.53	10.28	8	2
9.78	9.50	4	6	10.83	10.57	9	1
9.90	9.72	5	5				

Na₂CO₃ · 10H₂O 分子量=286.2, 0.1 M 溶液含 28.62% 克/升; Na₂HCO₃ 分子量=84.0, 0.1M 溶液含 8.40 克/升

[潘家秀等, 蛋白质化学研究技术, 科学出版社(1962)]

17. 磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液 (pH 11.0—11.9)

50 毫升 0.5 M Na₂HPO₄ (7.10 克/升), 加 x 毫升 0.1NNaOH, 用蒸馏水稀释至 100 毫升

pH, 25°C	x毫升 0.1NNaOH	pH, 25°C	x毫升 0.1NNaOH
11.00	4.1	11.5	11.1
11.10	5.1	11.6	13.5
11.20	6.3	11.7	16.2
11.30	7.6	11.8	19.4
11.40	9.1	11.9	23.0

[Bates and Bower, *Analyt. Chem.* 28, 1322 (1956)]

18. 氯化钾-氢氧化钠缓冲液 (pH12.0—13.0)

25毫升 0.2MKCl 加x毫升 0.2NNaOH, 用水稀释至100毫升

pH, 25°C	x毫升 0.2NNaOH	pH, 25°C	x毫升 0.2NNaOH
12.00	6.0	12.60	25.6
12.10	8.0	12.70	32.2
12.20	10.2	12.80	41.2
12.30	12.2	12.90	53.0
12.40	16.8	13.00	66.0
12.50	20.4		

[Bates and Bower, *Analyt. Chem.* 28, 1322 (1956)]

C. 常用酸碱溶液的比重及浓度配制

1. 硝酸溶液的比重和浓度

比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100克溶液含硝酸的克数	比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100克溶液含硝酸的克数
1.100	2.985	17.10	1.440	17.06	74.68
1.200	6.159	32.34	1.450	18.53	79.98
1.300	9.759	47.48	1.480	20.21	86.05
1.340	11.49	54.07	1.500	22.39	94.09
1.360	12.42	57.57	1.510	23.50	98.10
1.380	13.42	61.27	1.520	24.04	99.67
1.400	14.51	65.30			

2. 盐酸溶液的比重和浓度

比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100克溶液含盐酸的克数	比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100克溶液含盐酸的克数
1.100	6.037	20.01	1.160	10.03	31.52
1.110	6.673	21.92	1.170	10.74	33.46
1.120	7.317	23.82	1.180	11.45	35.38
1.130	7.981	25.75	1.190	12.15	37.23
1.140	8.648	27.66	1.200	12.87	39.11
1.150	9.327	29.57			

3. 硫酸溶液的比重和浓度

比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100 克溶液含硫酸的克数	比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100 克溶液含硫酸的克数
1.100	3.219	14.35	1.840	35.87	95.6
1.200	6.685	27.32	1.8405	35.99	95.95
1.300	10.39	39.19	1.8410	36.17	96.38
1.400	14.31	50.11	1.8415	36.54	97.35
1.500	18.26	59.70	1.8410	36.87	98.20
1.600	22.41	68.70	1.8405	36.99	98.52
1.700	26.75	77.17	1.8400	37.03	98.72
1.800	31.89	86.92	1.8395	37.05	98.77
1.810	32.59	88.30	1.8390	37.18	99.12
1.820	33.42	90.05	1.8385	37.23	99.31
1.830	34.39	92.10	1.837	37.66	100.00

4. 氢氧化铵溶液的比重和浓度

比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100 克溶液含氨的克数	比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100 克溶液含氨的克数
0.960	5.58	9.91	0.910	13.35	24.99
0.950	7.10	12.74	0.900	14.97	28.33
0.940	8.63	15.63	0.890	16.59	31.75
0.930	10.18	18.64	0.880	18.10	34.95
0.920	11.75	21.75			

5. 苛性钾溶液的比重和浓度

比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100 克溶液含苛性钾的克数	比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100 克溶液含苛性钾的克数
1.100	2.13	10.85	1.34	8.26	34.60
1.120	2.59	12.95	1.36	8.84	36.47
1.140	3.05	14.99	1.38	9.42	38.25
1.160	3.53	17.08	1.40	10.00	40.09
1.180	4.02	19.13	1.420	10.60	41.88
1.200	4.52	21.15	1.440	11.20	43.64
1.220	5.03	23.13	1.460	11.81	45.38
1.240	5.55	25.11	1.480	12.42	47.09
1.260	6.08	27.05	1.500	13.04	48.79
1.280	6.61	28.97	1.520	13.68	50.48
1.300	7.15	30.87	1.540	14.31	52.15
1.320	7.70	32.74			

6. 苛性钠溶液的比重和浓度

比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100 克溶液含苛性钠的克数	比重 d_4^{15}	溶液的当量浓度	100 克溶液含苛性钠的克数
1.100	2.47	8.99	1.320	9.54	28.92
1.120	3.02	10.79	1.340	10.31	30.78
1.140	3.59	12.59	1.360	11.13	32.74
1.160	4.17	14.39	1.380	11.96	34.66
1.180	4.78	16.19	1.400	12.81	36.60
1.200	5.40	17.99	1.420	13.70	38.58
1.220	6.04	19.80	1.440	14.61	40.58
1.240	6.70	21.60	1.460	15.56	42.62
1.260	7.37	23.42	1.480	16.54	44.70
1.280	8.68	25.25	1.500	17.55	46.80
1.300	8.79	27.07	1.520	18.58	48.90

中科院植物所图书馆



S0011868

收到湖 95.3.8.

95.3.2.

来源

节 价 24.80

卷之二

开票日期

月示日別 95.3.2

26394

58.1734

58.1734

261

书名 生物化学与制备技术

1986年社产

借者姓名	借出日期	还书日期
2000年1月18日	1986年8月16日	
2000年8月16日		

58.1734
261

注 意

- 1 借书到期请即送还。
- 2 请勿在书上批改圈点，
折角。
- 3 借去图书如有污损遗失
等情形须照章赔偿。

26394

京卡0701

ISBN 7-03-004198-4

Q · 515

定 价：24.60 元

科技新书目：323-110